

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 化學與生化農藥感測器及印刷式感測器之發展策略研究

(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-032-013-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：林孟山

計畫參與人員：王俊勝、呂晃志、葉秀炫、陳信良、吳義慶、賴建宏、蘇晟文、林雅婷。

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

## 目錄

中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
前言.....	1
研究目的.....	17
第一部分 除草寧農藥生化感測器.....	19
簡介.....	19
實驗部分.....	21
結果與討論.....	24
結論.....	38
第二部分 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統.....	39
簡介.....	39
實驗部分.....	41
結果與討論.....	43
結論.....	61
第三部分 連續式脈衝電極再生系統於乙烯硫脲的偵測.....	62
簡介.....	62
實驗部分.....	65
結果與討論.....	67
結論.....	87
第四部分 電激發化學發光之尼古丁農藥偵測系統.....	88
簡介.....	88
實驗部分.....	92
結果與討論.....	96
結論.....	116

計畫成果自評.....	117
參考文獻.....	119

## 中文摘要

本年度的研究是利用電化學與電激發化學發光分析技術，開發農藥生化感測器及光電化學之偵測系統，結合的技術包括：生化感測器、電化學分析、電激發化學發光、流注分析以及脈衝再生自動化系統等等，用以解決農藥偵測上的困難。以電化學方法偵測農藥時，常見的問題有：1. 種類繁多的農藥中許多是非電活性物種或2. 具電活性之農藥易在電化學模式偵測後造成電極的毒化，使得分析結果無法再現的缺點。因此研究中針對含氮類、醯胺類及酚類等等，非電活性或易形成電極毒化的農藥進行分析與研究，以解決上述常在電化學農藥分析上遭遇的問題，使光暨電化學技術在農藥的分析上更趨彈性及完備。

首先是以酵素辨識系統來開發農藥偵測的研究，目的是發展非抑制型且具分析線性長之農藥生化感測器。研究是藉由醯胺類分解酵素 (Aryl acylamidase, EC 3.5.1.13)，可選擇性辨識除草寧農藥的特性，先將除草寧農藥分解成苯胺類物質後，以拋棄式印刷電極配合微差脈衝電化學技術進行定量分析，此完成的電化學農藥生化感測器，有效延長了分析物操作濃度的線性範圍以及提高農藥分析的選擇性，改善了過去抑制型農藥生化感測器之偵測模式的缺點。

第二項的研究是利用化學反應前處理方式，將不具電活性或易毒化電極的物質做化性之改變後，再結合電化學農藥流注分析系統來偵測。研究是以硝酸銻胺氧化劑先與2,4,6-三氯酚農藥反應，生成還原氧化可逆的苯醌類氧化後產物，便可在低還原電位下偵測此苯醌類產物，並間接決定2,4,6-三氯酚農藥的濃度，此結果成功避免了使用高的氧化電位，因此同時解決了干擾及電極表面毒化之偵測窘境。

第三項是利用自動化流注分析技術發展連續式脈衝電位之電極再生系統，來解決電化學偵測時常發生的電極毒化現象。研究將整合了連續式電壓脈衝產生程式、自製電位儀和自動化流注分析系統，已開發出可快速且簡易操作的電極毒化再生分析系統，研究以偵測易毒化電極之乙烯硫脲農藥當範例，成功改善易毒化物質過去以電化學偵測時，操作再現性不佳的問題。

最後開發非電活性物質之烷基胺類的偵測，研究使用在溶液環境中穩定性佳的發光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，利用它會與烷基胺類作用並產生光訊號的特性，用以開發烷基胺類尼古丁之電激發化學發光農藥分析系統。此系統成功地展現電激發化學發光分析系統之高靈敏特性，且顯示其具有快速及穩定性偵測含尼古丁農藥之水樣分析的優點。

綜合上述，本研究已成功利用電激發化學發光與電化學分析系統，結合酵素辨識、流注分析及自動化脈衝再生技術，開發了多個符合簡便、快速、選擇性佳、高靈敏度及高再現性的農藥分析系統，而此研究理念與偵測系統將可進一步應用於臨床、藥物及其他環境污染的分析，未來更可將其發展成可攜式之分析工具，以達到及時分析與居家檢測的最終目標。

**關鍵字：**農藥、生化感測器、電化學、電激發化學發光、醯胺類分解酵素、硝酸銻胺、脈衝清除法、自動流注分析系統。

### 英文摘要(Abstract)

The goal of this proposal is to develop various schemes for pesticides determination based on biosensor, electrochemical, and electrogenerated chemiluminescent (ECL) system. The schemes offer solutions to measure non-electroactive species and to minimize electrode fouling.

We propose an enzyme based biosensor for propanil determination. The aryl acylamidase (EC 3.5.1.13) was modified onto disposable strip for biosensor development. The enzymatic reaction for propanil can produce 3,4-dichloroaniline which is detectable at oxidative potential. The results show both higher selectivity and longer linearity than inhibition based pesticide biosensors.

A preoxidation treatment was used for 2,4,6-trichlorophenol detection. In this study, ammonium cerium (IV) nitrate was used as an oxidant to convert 2,4,6-trichlorophenol to 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone. This product is easily reduced at -50 mV (vs. Ag/AgCl). The scheme shows high sensitivity and limited interferences for 2,4,6-trichlorophenol determination.

A continuously automatic pulse scheme is used to clean the electrode fouling in oxidative detection scheme. This system is integrated with continuous pulse cleaning program, computerized potentiostat, and automatic flow injection analysis (AFIA). It was used to avoid the electrode surface poison from ethylene thiourea oxidation. The result shows good reproducibility for ethylene thiourea determination.

At the last, the ECL scheme is based on the reaction of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  and its related coreactant to detect nonelectroactive aliphatic amines. The  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  is a good luminescence that has both high quantum efficiency and stability. The rapid, stable and highly sensitive system was established to Nicotine detection.

On the basis of above results, this proposal has demonstrated several methods to solve the disadvantages of previous detection by using enzyme, chemical pretreatment, automatic pulse cleaning, and ECL system. Their merits include easy operation, prompt response, high selectivity, high sensitivity, and good reproducibility for pesticides determination. In the future, the schemes can be applied to clinical, pharmaceutical, and environmental analysis. Otherwise, they will be developed to portable device for local and home-care applications.

**Keywords:** Pesticide, Biosensor, Electrochemical, Electrogenated chemiluminescent, Aryl acylamidase, Ammonium cerium(IV) nitrate, Pulse cleaning, Automatic flow injection analysis.

## 前言

環境污染是個常可聽到的名詞，其涵蓋範圍廣闊，美國環境保護署（Environmental Protection Agency, EPA）曾下了這樣的定義，“任何物質進入環境中，會對有用的資源造成負面的影響都稱為污染”，而全球性的工業發達及科技快速發展，造成地球上的污染日益嚴重，對人類及環境的危害也不在話下，因此近來的環保意識不斷高漲，所有身長在地球村的人們，為了減低受這些環境污染物的迫害，需對這些物質的來源及其危險性有一定的認識，但由於污染物的總類繁多，要明確地分類其項目有相當困難性存在，在此若簡單的以化學組成來分可歸納成有機、無機及有機金屬污染，而依其污染的範圍<sup>(1)</sup>更可區分為空氣污染、水污染、固體的污染、金屬污染及農藥污染。

空氣污染的主要成分有一氧化碳 (CO) 或二氧化碳 (CO<sub>2</sub>)、二氧化硫 (SO<sub>2</sub>)、氮氧化物 (NO<sub>x</sub>)、臭氧 (O<sub>3</sub>)、有機揮發物和粉塵等等，而大量的傳統能源消耗，如汽車工業和耗電用品及機器，也是產生這些這些污染物質的元兇，這些污染物會形成酸雨而造成水資源、森林和土壤的破壞，形成溫室效應以及臭氧層和全球氣候的劇烈變化。水污染的原因包括有機污水的排放、過量含氮物質、過酸或過鹼化、懸浮固體、油污、細菌或病毒及有毒物質等等所造成的污染，當然這些污染的後果是造成水中生物大量死亡或突變、人們的飲用水質惡化，甚至使得陸地上及空中生物的生存受到嚴重的威脅。固體的污染其實就是固態廢棄物，舉凡玻璃、紙類、金屬製品和塑膠等等，若不做好資源回收，減少不必要的廢棄物生成，而讓垃圾問題繼續惡化下去，人們最後會被自己製造的垃圾給淹沒。人類的生存需仰賴許多微量金屬元素，但過量的金屬累積則會造成中毒，而常見的金屬污染有鉛、汞、鎘、砷及硒等等之重金屬污染，易造成弱智、神經系統及內臟功能的損壞。

農藥使用的目的是使農業產品的品質及數量能提升，分類上以殺蟲劑、殺菌劑和除草劑等等為大宗；農藥可破壞害蟲及細菌的神經系統或體內代謝運作的機制，以達到保護農作物的效果，但不當的使用對人體及環境將會形成莫大的危害。它對人類的危害包括劇毒特性、致癌性 (carcinogenicity)、神經毒性 (neurotoxicity)、致畸形胎 (teratogenicity) 及致突變 (mutagenicity) 等等，且一些著名的農藥如滴滴涕 (dichloro-diphenyl-trichloroethane, DDT)、多氯聯苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 和戴奧辛 (Dioxins) 等等更已被證實為危險致癌物。因此本研究將對農藥的應用情形、過去的分析方法及其所造成的負面效應，乃至發展新的農藥檢測分析方法做廣泛性的探討，以防範及降低其對人體及環境的傷害。

## 農藥偵測之重要性

空氣、水、食物是人類生存的三大因素，隨著人口快速的成長，對食物的需求也呈急速的增加，為了滿足人類糧食上的需求，就需要有更多的空間來種植農作物已獲取大量的收益，而農藥的使用則可解決這個問題並提高農地的產量。正確的使用農藥可以防止病蟲害減少農作物的損失，對農作物品質與產量的提升有很大的貢獻，但是人類過度使用農藥來創造出更高產量與經濟價值，因此造成農藥濫用的情況日益嚴重，過度使用農藥會造成殘留與環境污染；以化學角度而言，在低濃度的農藥殘餘在自然界中，大自然尚有有限的能力將其分解成較無害

的物質，當大量的農藥被使用時已經超出大自然所能分解之能力，就會造成殘留的現象，衍生出環境的污染及傷害，這個問題在為了使人類在糧食上不虞匱乏，伴隨著需求的增加而日趨嚴重。

農藥毒性能消滅農作物的病蟲害，也會對人體造成殺傷力，這是一體的兩面，人類過去不斷的研究要如何發展出具有兩者兼顧的農藥，而自律並使用適當的藥量及遵守使用規範，或可使得食物具有最大之安全性的保障，但是目前農藥殘餘所造成的毒性污染還是個非常嚴重的問題，這些殘餘農藥全部被人類吃到肚子裡，日積月累形成身體上重大的負擔，也是種下日後許多疾病的根源；因此若能發展出輕便簡易之偵測方法，使大眾有了檢驗的方法或是鑑別殘留農藥的能力，或許農藥濫用的問題便可以獲得解決，這也是大家所期盼的結果，所以發展一個簡便且精確的分析方法，能夠即時量測食物中殘餘農藥的含量，讓消費者可以輕鬆的選擇安全與健康的食物並為自己的健康把關，便是發展光電化學農藥化學與生化感測器的主要目的。

農藥主要是在防除農作物之病、蟲害與調節生長等用途，而每種農藥的藥理毒性、化學結構、作用機制及防治對象都不盡相同，因此國際上對農藥的分類以防治對象來區分，此種分類方法較為詳盡<sup>(2,3)</sup>，此外亦可利用化學觀點以不同的官能基作為區分，此種方式較有利於探討農藥的反應機制與毒性作用<sup>(4)</sup>。

而我國根據國際標準將農藥分為八大類，其分類如下：殺菌劑(fungicide)、殺蟲劑(insecticide)、殺線蟲劑(nematocide)、除草劑(herbicide)、輔助劑、殺蟎劑(miticide)、殺鼠劑(rodenticide)及植物生長調節劑(plant growth regulator)。在上述農藥中以殺蟲劑、殺菌劑及除草劑的使用量最大，而且這些農藥都具有某種程度的毒性，對人、畜和環境都會有負面的影響，以下將針對(1)除草劑、(2)殺菌劑及(3)殺蟲劑等三大宗農藥做廣泛性的討論。

## (1) 除草劑農藥

生活週遭中常見的雜草為數眾多，雜草的繁殖對農作物養分的吸收及生長環境造成不利的影響，而除草劑就是用來消滅雜草讓農作物有更好的生長環境，因為雜草的種類繁多針對特定雜草所發展出的除草劑更多，因此無法以成分來分類只好選擇使用類別來區分較為方便。除草劑分為二大系統，無機除草劑與有機除草劑，無機除草劑早年曾被廣泛的使用，直到後來發現無機除草劑殘留期很長，會造成環境中重大的污染，因此近年來大多採用有機除草劑以減低對環境所造成的傷害。在類別上可分為選擇性藥劑、非選擇性藥劑、接觸型藥劑、系統性藥劑。選擇性藥劑又可分為單一型選擇性藥劑與廣泛型選擇性藥劑，單一型選擇性藥劑可針對闊葉型或禾草型的雜草進行清除，廣泛型選擇性藥劑可同時消滅闊葉型及禾葉型雜草，此類型的除草劑並不會對農作物造成傷害。非選擇性藥劑是將所有的植物都清除乾淨，因此在使用上要格外的謹慎。接觸性藥劑是指在農藥噴灑範圍內的雜草會被清除，對於一年生的草本類雜草有顯著的效果，而對多年生的雜草僅具有在噴灑農藥時就存在的雜草才有效。只需要局部性噴灑的系統性藥劑，可藉由植物本身的運送系統將農藥傳送到未噴灑的部分或未噴灑的區域來發生作用，達到局部施藥全面除草的目的。

除草劑的作用方式可分為阻止雜草進行光合作用的含氮雜環與尿素類農藥<sup>(5)</sup>；阻礙蛋白質的合成或是將蛋白質變性造成雜草無法生長的苯基尿素衍生物、酚類、氨基甲酸與有機酸類農藥；影響細胞分裂及干擾核酸代謝的苯甲酸類與苯

氧基酸類農藥<sup>(6)</sup>；以及抑制酵素活性的二硝基苯胺類除草劑<sup>(7)</sup>。其中又以苯基尿素衍生物除草劑最為常見，由於此系列農藥的使用量大，且具有毒性及致癌性，因此對動物及人體的傷害不容忽視，所以偵測食物、飲用水及環境中此系列農藥的殘留含量是必需的，以下將對其分析方法做完整的回顧，並瞭解其分析上的優缺點，進而發展成具有選擇性除草劑農藥之生化感測器。

苯基尿素衍生物在農業上主要作用為除草劑，其使用量很大，通常可分為有選擇性及無選擇性除草劑。前者有使用在穀類作物的 chlortoluron 和 isoproturon、使用在棉花的 fluometuron、使用在馬鈴薯的理有龍 (linuron)、使用在草莓的 chloroxuron 等，而後者最常見的是達有龍<sup>(8)</sup> (diuron)。此系列農藥的作用機制是經由植物根部吸收後，轉移到作用處，進而阻礙了光合成的電子轉移<sup>(9)</sup>並達到除草的目的。

此系列農藥對哺乳動物的直接毒性不高，但其分解產物芳香胺在動物實驗中被報導具有毒性及致癌性質<sup>(10,11,12,13)</sup>，這些物質雖有光不穩定性，但其仍會存留在環境中一段時間，視溫度及 pH 值而定。據美國加州環保局初步估計，在飲用水中達有龍的含量不能超過 10 µg/L，而歐盟規定在飲用水中任何一種除草劑的允許含量為 0.1 µg/L。

一般偵測苯基尿素衍生物農藥是以氣相層析法 (gas chromatography, GC) 及高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 做分離，並配合不同技術及偵測器分析在食物及水中的含量<sup>(14,15,16)</sup>，但使用氣相層析方法來分析此系列農藥，會因其熱不穩定性，即醯胺鍵 (HN-CO) 的斷裂而使該農藥分解，生成芳香胺衍生物而造成氣相層析分析上的限制，因此後來大多使用 HPLC 方法做分離。所以美國環保署檢驗方法 (EPA 632)，便是利用 HPLC 分離並配合紫外光偵測器來分析廢水中數種苯基尿素衍生物系列的農藥。

Worobey<sup>(17)</sup> 使用氣相層析法來測定除草劑理有龍，由於理有龍於高溫下熱穩定性不佳，於 GC 中偵測容易因系統的高溫而分解，故其利用七氟丁酸酐 (heptafluorobutyric anhydride) 及碳酸鈉 (sodium carbonate) 對理有龍作衍生化，以提高於 GC 系統中偵測時的熱穩定性，並利用電子捕捉偵檢器 (electron-capture detector, ECD) 來作偵測，其偵測極限可達 0.128 ng。

Fischer 和 Jandera<sup>(18)</sup> 等，將 HPLC 填充管柱所固定的靜相物中鍵結腈基 (nitrile) 和胺基 (amino) 兩種官能基，使用 2-丙醇 (2-propanol) 及正己烷 (n-hexane) 或 2-丙醇與水做為動相，可成功的分離苯基尿素衍生物農藥。使用腈類衍生物作為靜相及包含 80 ~ 90% 2-丙醇的水當動相可得到最短的滯留時間，但是靜相為胺類衍生物時，包含 2-丙醇的水溶液為動相，其滯留時間太短無法達到分離的效果。雖然在水溶液/有機動相中，在腈類衍生物靜相中的滯留時間比胺類衍生物靜相長，但是對於分離苯基尿素衍生物農藥的選擇性較佳，因此將二者結合，發現大部份的苯基尿素衍生物農藥化合物皆可被分離。

Walter<sup>(19)</sup> 藉由 HPLC-UV 及 HPLC-UV-PCD 來偵測數種尿素衍生物 (phenylurea) 系列的農藥，其中光導電度偵檢器 (photoconductivity detector, PCD) 可加強近紅外光區的吸收，這是一種類似於半導體的原理，將吸收光強度的變化轉變成半導體中電阻值的高低，再利用半導體導電度的改變來分析訊號的大小，如此具有雙重提高解析度的功用。研究方法是藉由 Zorbax CN 管柱分離後，並使用紫外光偵測器來進行分離偵測十八種苯基尿素衍生物，且除了使用 HPLC-UV 系統外，還在 UV 之後串聯 PCD，利用苯基尿素衍生物經 UV 照射產生遊離離子的強度大小，造成導電度的不同來偵測之，配合 UV 與 PCD 兩



者的使用可達到偵測草莓園中使用的 chloroxuron 限制量 0.5 ppm 的標準，由文中比較得知 HPLC-UV-PCD 的方法，改善了只使用 HPLC-UV 系統靈敏度較差的缺陷。

Gennaro<sup>(20)</sup> 也同樣是利用 HPLC-UV 系統分析苯基尿素衍生物類的除草劑農藥，如：亞速爛 (asulam)、達有龍、isoproturon、linuron 和 monuron 等，分析方法是將這些農藥經 HPLC 系統流經碳 18 (C18) 和離子作用試劑磷酸辛胺 (octylammonium phosphate) 組成的靜相管柱，以達到苯基尿素衍生物分離的目的，再以 UV 偵測器藉由苯基尿素衍生物對光吸收的強度來定量濃度，此法偵測此類農藥的極限值低於 9 µg/L，此系統的運用，讓 UV 偵測苯基尿素衍生物的靈敏度較前者大為提高，並可用於河流的水質檢測。

而 Luchtefeld<sup>(21)</sup> 建立了一套新的 HPLC 方法結合前置管柱光解與衍生化 (postcolumn photolysis and derivatization, PPD) 來分析在食物中苯基尿素衍生物系列的農藥，此方法是利用苯基尿素衍生物經光分解後產生一級胺衍生物，再與鄰苯二甲醛 (*o*-phthalaldehyde) 及乙基硫醇 (2-mercaptoethanol) 反應生成具有螢光性質的吲哚 (indole) 類衍生物，最後使用螢光偵測器偵測。在 2000 年 William<sup>(22)</sup> 等人利用 HPLC 方法結合了固相萃取 (Solid phase extraction, SPE)，並配合二極體陣列偵測器 (diode array detector, DAD) 及 PPD 偵測系統對水中尿素衍生物系列的農藥進行偵測。其中 PPD 偵測系統是使用 Luchtefeld 所建立的方法，而 DAD 系統是在紫外光波長 245 nm 下進行偵測，此兩種偵測系統以 PPD 偵測系統較有選擇性，但其偵測極限較差，是 DAD 系統之偵測極限 4~40 ng/L 的五倍濃度。

截至目前為止，大部份農藥的分析方法都集中在 GC 和 HPLC 的應用上，然而這兩種分析方法主要缺點包括所需操作時間較長且靈敏度不夠好，通常需數十分鐘或幾小時而偵測極限為百萬分之一 (ppm) 的等級，若配合 ECD 可達 0.1 ppb (十億分之一)。若能配合使用電化學的方法來偵測，或可縮短分析操作時間，同時希望因技術的改進更達更高的靈敏度。

Brett<sup>(23)</sup> 等人使用微差脈衝伏安法 (differential pulse voltammetry, DPV) 及方波伏安法 (square wave voltammetry, SWV) 來分析除草劑本達隆 (bentazon) 的殘留量，它是環境中常見的闊葉類之選擇性除草劑。在 Brett 的研究中發現，本達隆除草劑於 0.2 M, pH 3.4 的醋酸 (acetate) 緩衝溶液中，於 +960 mV 處可得到氧化電流訊號，但隨著實驗操作次數的增加，氧化訊號也越來越小，由此可知本達隆除草劑可能會對電極造成毒化的現象，此處加入 Triton 界面活性劑後成功的減低毒化現象，提升了分析系統的再現性，在最佳化條件所得到的偵測極限為 10 µM。

因為質譜分析技術的演進，其應用在偵測苯基尿素衍生物系列農藥上漸漸取代了如紫外光等傳統的偵測器。在 1999 年 Corcia<sup>(24)</sup> 等人利用液相層析法結合電灑法質譜儀 (electrospray mass spectrometer, ES-MS) 配合 SPE 方法，來同步偵測苯基尿素衍生物系列的農藥及其分解產物，如：去烷基產物和芳香胺 (aromatic amine)，主要是利用腐質酸 (humic acid) 與芳香胺結合來偵測此類農藥。

Levsen 和 Schafer<sup>(25)</sup> 等利用微小液相層析管柱的特殊專一性和質譜儀的高靈敏度，從事於多環芳香烴、酚 (phenol) 和脂肪酸 (aliphatic acid) 的研究，藉此來分析水裡面苯基尿素衍生物的殘留量。使用丙烯腈 (acetonitrile) 當溶

劑，以微小的 RP-18 逆相 (reversed-phase) 層析管柱來分離，並以單離子選擇模式之質譜儀來分析，其偵測極限可達 30 pg。

Geerdink<sup>(26)</sup> 等使用 Heptafluorobutyric anhydride (HFBA) 直接測量苯基尿素衍生物的十五種衍生物。首先，將 HFBA 與樣品混合均勻，搖晃一分鐘後靜置五分鐘，再加入 1 M 氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 後，即可在有機層中得到 HFBA 的衍生物。此種衍生化法可用在 fenuron、isoproturon、chlortoluron、metoxuron 及少量的達有龍衍生物，此衍生物使用 GC-MS、GC-ECD 及 HPLC-ECD 系統偵測時，具有更好的靈敏度及選擇性，使得表面水和農作物中的農藥殘留量，其分析範圍可從 20 ppb 到 0.1 ppb。

Levsen 等人利用微小型液相層析系統所具有的選擇性，搭配具有高靈敏度特性之質譜儀，發展出偵測苯基尿素衍生物農藥的方法<sup>(25)</sup>，在研究中利用逆相的 RP-18 微小層析分離管柱，先將苯基尿素衍生物農藥分離出來，再透過質譜儀進行檢測，偵測極限可達 30 pg。

2001 年 Draper<sup>(27)</sup> 利用 Electrospray quadrupole ion trap liquid chromatography-mass spectrometry (ES-QIT-LC-MS) 來偵測水溶液中苯基尿素衍生物系列的農藥，如達有龍、Neburon、Metobromuron、和 Siduron 等，其偵測極限在 10 ~ 50 pg 間。

另外，在 2000 年 Terabe<sup>(28)</sup> 等人使用逆向之微胞電泳層析法 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) 來分離三種苯基尿素衍生物系列之的達有龍、Monuron 和 Isoproturon 等農藥。在此分離系統中配合三種技術來提昇偵測的靈敏度，包括：堆疊之逆向泳動微胞系統、使用 Z 形偵測槽及分析前使用 SPE 技術處理樣品。

近年來有人開始嘗試使用具有選擇性的酵素或抗體做農藥分析，在 2000 年 Stöcklein<sup>(29)</sup> 等人利用酵素鍵結免疫分析法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 方法來偵測三井 (Triazine) 衍生物及苯基尿素衍生物系列的農藥，他們首先使用有機溶劑，如乙醇萃取農藥，再使用抗體 K4E7 及 B76-BF5 做選擇性偵測。

## (2) 殺菌劑農藥

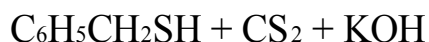
殺菌劑可分為無機殺菌劑和有機殺菌劑，無機殺菌劑依主要成分的不同又可分為硫劑、銅劑及汞劑，而有機殺菌劑可分為有機硫磺劑、有機錫劑、燻蒸劑、苯類衍生物、含氮雜環類及抗生素。殺菌劑可以解決因真菌所引起的病害，以作用方式可分為與蛋白質或酵素結合使其變性後失去活性或功能，例如：無機硫磺劑、銅劑、汞劑、有機硫磺劑、苯衍生物；阻礙或干擾微生物體內蛋白質、酵素或其他作用的合成，例如：含氮雜環類、有機錫劑、抗生素；直接撲滅病原菌，例如：燻蒸劑。接著我們也將對殺菌劑的分析法做一簡單介紹，分別敘述如下：

Cabras<sup>(30)</sup> 等利用 RP-8 管柱之 HPLC 系統來測量空氣中白色灰塵和酒萃取物中的 Vinclozolin、Iprodionin、Procymidone、Dichlozolate 和其變質的產物 3,5-二氯苯胺 (3,5-dichloroaniline)，其中 Vinclozoline 和 Iprodione 等物質，是葡萄園中被廣泛用來控制 Botrytis cinerea 的殺菌劑，使用 UV 偵測器，波長為 210 nm，偵測極限可達 0.05 ppm。

Collinge 和 Noirfalise<sup>(31)</sup> 使用填充 Polygosil 管柱的 HPLC 系統來測量塞苯大唑 (thiabendazole, TBZ) 殺菌劑的殘留量，其所使用的動相為水溶液中含有

0.8% (w/v) 的硝酸銨 (ammonium nitrate) 與 0.7% (v/v) 的氨水/甲醇 (ammonia/methanol, 1:1) 之緩衝溶液，偵測器波長為 305 nm，偵測極限可達 0.1 ppm。TBZ 是一種常用在柑橘類、香蕉等水果的殺菌劑，歐洲國家以及北美國家的規定其標準使用濃度為橘子 6~8 mg/kg，香蕉 3 mg/kg，而在台灣此種農藥的使用也十分普遍。

Verma<sup>(32)</sup> 則是利用二硫代胺基甲酸鹽 (dithiocarbamate) 水解出的二硫化碳 (carbon disulfide) 與苯乙基硫醇 (benzyl mercaptan) 和氫氧化鉀 (potassium hydroxide) 於 80% 三級丁基醇 (tertiary butyl alcohol) 進行以下反應：



產生淡黃色一價之苯基三硫碳酸鉀 (potassium benzyl trithiocarbonate)，此物質於  $\lambda=430\text{nm}$  處有光譜吸收訊號，經由比爾定律可得其濃度線性範圍在 14~150  $\mu\text{g/ml}$  相當於二硫代胺基甲酸鹽的濃度 59~630  $\mu\text{M}$ 。Gupta<sup>(33)</sup> 提出分析鋅乃浦 (zinc ethylene bisdithiocarbamate, Zineb) 的方法，將鋅乃浦以酸處理分離出的硫化氫 (hydrogen sulfide) 與含三乙醇胺 (triethanolamine, TEA)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide)、乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 之混合溶液作用，在和 N-N-dimethyl-p-phenylene diamine sulphonate 及氯化鐵 (ferric chloride) 反應形成具光吸收活性的亞甲基藍 (methylene blue)，如此間接定量鋅乃浦，其分析遵守比爾定律的線性為 3~32 ppm。不久，Gupta<sup>(34)</sup> 又於 1998 年將二硫代胺基甲酸鹽以酸處理分離出的二硫化碳經衍生步驟形成於  $\lambda=595\text{nm}$  具吸收特性的 Crystal violet dye，亦可間接定量二硫代胺基甲酸鹽，此法偵測得恩地 (thiram)、Ziram 和鋅乃浦之線性範圍分別是 0.02~0.20、0.02~0.24 及 0.04~0.32 ppm，比前兩者所述有較低的偵測極限。Rao<sup>(35)</sup> 亦用光譜吸光分析法，直接將 Ziram 與硫氰酸鹽 (thiocyanate) 和 2-硫-4-氧氫塞唑 6G (rhodamine 6G) 生成紫色錯和物，可在波長等於 570 nm 處偵測二硫代胺基甲酸鹽的濃度，分析 Ziram 的偵測極限值為 1.31  $\mu\text{M}$ 。而 Rao<sup>(36)</sup> 於 tetraphenylborate 的存在下，將富爾邦 (ferbam) 吸附在微小結晶之萘 (naphthalene) 上，形成具光吸收性質之鐵-菲啉 (iron-phenanthroline) 錯和物，利用此吸光物質於波長等於 515 nm 處可間接定量富爾邦，其偵測濃度之線性範圍為 22~373  $\mu\text{g}$ ，後兩者的分析方法是直接對 Ziram 或富爾邦進行衍生化而偵測，所以較前兩者為準確，但只適用於對 Ziram 或富爾邦的個別分析。

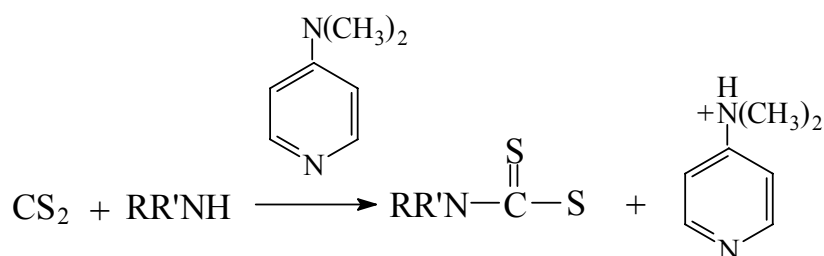
Gustafsson<sup>(37)</sup> 先將含金屬等二硫代胺基甲酸鹽化合物以 EDTA 和氫氧化鈉處理成不含金屬鹽類，再經甲基化過程形成 N,N-dimethyldithiocarbamate 之鹽類，前述步驟處理後利用 HPLC 之甲基化離子對分析管柱分離，並配合以 UV 作為偵測器，在波長為 272 nm 處可成功的偵測二硫代胺基甲酸鹽化合物，如：鋅乃浦、ziram 和得恩地，個別的偵測極限分別為 0.05、0.01 和 0.01 ppm。Sedlak<sup>(38)</sup> 則是將二硫代胺基甲酸鹽樣品先於 pH 4 之醋酸鈉 (sodium acetate) 和硫酸銅 (copper sulfate) 反應形成穩定的  $\text{Cu}(\text{dtc})^+$  後，直接注入含己烷磺酸鈉鹽 (1-Hexanesulfonic acid sodium salt) 離子對試劑之碳 18 逆向分離管柱中，有效分離多種二硫代胺基甲酸鹽化合物，並經 UV 光譜之波長定於 260~287 nm 處偵測二價銅鍵結之化合物的訊號。此方法的偵測極限於分析 Ziram、鋅乃浦 (Maneb) 和乙基黃原酸鹽 (ethylxanthogenate) 分別可達 20、33 和 23 nM，

與 Gustafsson 相較具有分析步驟較簡便和較高靈敏度的優點，但分析樣品所需時間頗長，是需改善的地方。

Lo<sup>(39)</sup> 為了能明確地分辨甲基鋅乃浦 (Propineb)、鋅乃浦、錳乃浦和鋅錳乃浦 (Mancozeb)，這些含金屬的二硫代胺基甲酸鹽錯和物，使用 HPLC 當分離系統，並以原子吸收光譜 (atomic absorption, AA) 作偵測器，由於 AA 具有對金屬原子偵測的高靈敏性，使得本系統能有效的分辨出分析物中各類金屬二硫代胺基甲酸鹽錯和物的含量，但其應範圍有限，只適用於含金屬錯和物。

Pomerantz 等利用 GC-ECD 定量分析四氯丹 (Captafol)，蓋普丹 (Captan)，福爾培 (Folpet) 三種殺菌劑<sup>(40)</sup>，此三種殺菌劑的結構非常相似，急毒性並不高其 LD<sub>50</sub> 大於 5g/kg，但是有導致癌症 (carcinogenicity) 及致畸形胎 (teratogenicity) 的危險，屬於酞醯亞胺 (Phthalimide) 類的殺真菌劑。而 Baker 和 Flaherty<sup>(41)</sup> 的研究也是採用 GC-ECD 的方法，來進行酞醯亞胺類的殺菌劑檢測。

Schwack<sup>(42)</sup> 將二硫代胺基甲酸鹽和硫代胺基甲酸鹽 (thiocarbamate) 以熱與酸進行分解，分別讓其生成 CS<sub>2</sub> 及 COS，再與甲醇六氫吡啶 (methanolic piperidine) 試劑進行吸附後，以微差脈衝極譜法 (diffetential pulse polarograph) 的電流測量技術，於 E=-0.57 和 E=-0.36 V (vs. Ag/AgCl/(0.1M LiCl)) 測得 CS<sub>2</sub> 及 COS 的還原訊號。此方法可分析 CS<sub>2</sub> 及 COS 的線性範圍分別為 1.5 ~ 9.2 和 2.1 ~ 12.6 μM。Chan<sup>(43)</sup> 也是使用微差脈衝極譜法的測量技術，將二硫代胺基甲酸鹽分解成胺類後，利用以下反應：



Polarographically inactive

Polarographically active

再把胺類衍生為具極譜法電活性的物質，以偵測胺類間接定量二硫代胺基甲酸鹽，以此方法偵測胺類的線性範圍在 5 ~ 25 μM。

### (3) 殺蟲劑農藥

殺蟲劑是使用最頻繁的農藥，對人類與環境的影響也較大，因此將先對殺蟲劑作初步的介紹：殺蟲劑能可分為胃毒劑與觸殺劑，胃毒劑是利用消化器官吸收而導致中毒死亡，例如：巴拉松 (parathion)、大滅松 (dimethoate) 等；另一類觸殺劑是透過膚滲透後吸收而中毒死亡，例如：除蟲菊 (chrysanthemum cinerariaefolium) 和撲滅松 (fenitrothion) 等。若依成分可分為無機殺蟲劑和有機殺蟲劑，無機殺蟲劑大多含有砷、汞、銻、氟等，有機殺蟲劑的成分為有機氯 (organochlorine)、有機磷 (organophosphorus)、有機錫 (organotin)、

胺基甲酸鹽 (carbamate) 等。殺蟲劑作用方式的種類較複雜，其中最常見的作用是農藥與乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase) 結合<sup>(44)</sup>，造成神經突觸堆積大量的乙醯膽鹼酯，導致過度刺激而昏迷或死亡，此類農藥包含有機磷劑、氨基甲酸鹽、植物性殺蟲劑等；另一類是干擾、抑制細胞內氧化磷酸化的過程，阻礙腺核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 等能量儲存分子的形成<sup>(45)</sup>，例如：無機砷化物和有機錫劑等；至於無機氟化物則是與細胞內酵素所含有的鈣、鎂離子結合<sup>(46)</sup>，破壞酵素功能導致生物體死亡；最後一個是已經被禁用的有機氯農藥，此類殺蟲劑能破壞神經系統，造成生物體肌肉抽筋或死亡，而此類殺蟲劑的效能廣泛，曾經被人類大量的使用，其中最具有代表性的是滴滴涕。日常生活中最常接觸到的農藥殺蟲劑主要分成兩大類：第一類是有機氯殺蟲劑，另一類是有機磷殺蟲劑；凡舉穀類、蔬菜、水果等，都是屬於殺蟲劑應用的範圍，所以殺蟲劑常對人體健康造成很大的危害，因此發展殺蟲劑農藥電化學感測器是另人相當感興趣的目標，以下對這兩類殺蟲劑的特性及分析方法做更進一步的介紹。

有機氯農藥是個很穩定的物質，在動物體內及環境中不易分解，藉由動物體食入受到污染的農作物而積蓄在脂肪組織裡，這個現象會隨著食物鏈中生物所屬層級越高而越嚴重，當食物鏈金字塔頂端的生物吃到被有機氯污染過的食物，這些有毒的物質便急速地累加在食物鏈金字塔頂端的動物體內，而造成嚴重的毒害；人類在食物鏈中所扮演角色就屬於金字塔頂端的動物，人類攝食的範圍很廣，包括穀類、蔬菜、水果、家禽、家畜等等，很容易就累積了過量的毒素而造成中毒的現象，因此對食物的安全要格外的小心謹慎。一般有機氯中毒會產生中樞神經症狀，且中毒後沒有任何特效藥可以解毒，而嚴重中毒者會導致昏迷或死亡，由於有機氯農藥殘留及毒性的問題無法解決，因此國際間早已禁止使用此類的農藥，從民國 2001 年起，更被規定除試驗、研究、教育外，一律禁止使用，國內已盡可能的防堵其運作來源，以杜絕持久性有機氯污染物質對人體健康及環境污染的危害。

由於有機氯是屬於長效性 (persistence) 的農藥，為脂溶性 (lipophilic) 而具生物累積性 (bioaccumulation)，此環境雌激素 (environmental estrogens) 是環境荷爾蒙的一種。殘留在環境中的時間相當長，不易分解、代謝，可透過食物、水源及皮膚接觸等，進入生物體而造成累積。根據研究指出，長期暴露於高濃度的有機氯化學物質，會增加產生畸形兒的比例、不孕、智慧減退、免疫力降低、慢性病及致癌<sup>(47-48)</sup>等機率，此外有機氯農藥的毒性皆屬於劇毒性，也會干擾中樞神經系統<sup>(49)</sup>的正常運作造成中毒。而累積在人體組織內的有機氯，亦可經由母體臍帶之傳輸進入胎兒，或由母乳傳給幼兒，增加幼兒暴露在有機氯污染的機會，因此有機氯對胎兒的影響亦令人擔憂。

有機氯農藥如：滴滴涕、阿特靈 (aldrin) 和四氯異苯腈 (chlorothalonil)，可用於甘薯、煙草和蔬果等作物。對人體的毒性屬非急性，但由於這類含氯有機物相當穩定，會於人體組織內長期累積，會對神經系統造成破壞，因此是高毒性農藥，長期高劑量的暴露於有機物氯物質下更會導致肝臟腫瘤，更有導致癌症的可能<sup>(50)</sup>。目前已遭禁用的農藥中，滴滴涕和六氯苯 (benzenehexachloride) 二種農藥在土壤中的穩定性便長達二、三十年，然而農藥的慢性毒性卻一直到六十年代初期才被提出<sup>(51)</sup>，原因是鳥類在吃了含有滴滴涕農藥的昆蟲後，所產下蛋的蛋殼是軟的，無法承受母鳥孵化時的體重而破裂，造成鳥類瀕臨絕跡，各國政府於是開始警覺到農藥殘留的嚴重性，並積極地展開農藥慢性毒性的評估工作。如今，

農藥殘留問題是世界性的問題，世界各國的農產品、河川、湖泊受到農藥污染的報導時有所聞，可見農藥的濫用已使得人類得採取更積極的防備措施<sup>(52)</sup>。

有機氯化合物的持久性不易被分解、且具有揮發特性，可釋放於大氣中而經由沉降作用回到地面上，這樣轉移現象一再反覆進行，使得這些化合物經由大氣傳播而遍佈世界每個角落，累積在食物鏈中，並長期滯留於自然環境中，毒害我們自己。近幾年的研究報告中指出，在曾經使用過有機氯農藥的地區中，無論是畜牧業、漁業甚至是人體內均已檢驗出有機氯農藥的含量；在墨西哥的牛乳中無論是事先採集的鮮乳或瓶裝的牛乳均檢驗出滴滴涕的含量高達 0.159 mg/kg 及 0.043 mg/kg<sup>(53)</sup>，在人類的調查中指出在母乳採樣中發現到母乳中殘留有林丹、滴滴涕等有機氯農藥的殘留，其中滴滴涕含量的範圍由 0.33 $\mu$ g/L 到 278 $\mu$ g/L<sup>(54)</sup>。而在台灣對 12 個牡蠣養殖區對有機氯農藥滴滴涕的檢測中發現，在金門及馬祖地區的牡蠣所含的滴滴涕含量分別有 337 ng/g 及 340 ng/g<sup>(55)</sup>。另外在北太平洋以及南太平洋信天翁也發現了大量的有機氯農藥殘留量<sup>(56)</sup>，顯示出在陸地上使用的有機氯農藥除了由植物轉入動物體內也流入海洋中污染了水循環系統。另也有報導指出有機氯農藥在收集的空氣樣品中被檢測出來<sup>(57-58)</sup>。

因此在 2000 年 12 月 10 日，聯合國環境部在南非約翰尼斯堡召集全球 122 國代表，達成自 2001 年起全面禁用或嚴格限用十二種持久性有機污染物，其中包括滴滴涕、阿特靈、地特靈 (dieldrin)、安特靈 (endrin)、飛佈達 (heptachlor)、蟲必死 (hexachlorobenzene)、可氯丹 (chlordane) 和滅蟻樂 (mirex) 等九種有機氯農藥。此外，聯合國環境規畫總署 (UNEP) 計畫將管制持久性有機污染物的相關公約內容，於 2001 年 5 月聯合國大會時，開放聯合國會員國簽署，因此未來 5~10 年內，有機氯農藥之管制將是全球最重要的環保議題之一。

國際上已針對持久性有機污染物進行全面性的調查，根據美國在 2000 年 11 月的調查中發現，美國幾乎所有的食品如蔬果、肉品和乳製品等等，皆受到持久性有機污染物的污染，在單項食品中常含有 3~7 種持久性有機污染物。而歐盟在 2000 年底發表的研究報告指出，歐洲地區所出產的魚類，其戴奧辛含量最高可達其他非工業地區如秘魯和智利的 8 倍，是歐洲肉類和蛋類的 10 倍，其中肉食性魚類如鮭魚等的戴奧辛含量又比草食性魚類高的多。

儘管我國禁用含有機氯成分的農藥，部份已禁用超過 20 年，但其生物鏈累積毒性的特性，使得這些毒物至今依然存在於環境中，在 2000 年底衛生署委託檢驗藥材中的農藥殘留時，檢出部分人參中含有有機氯成分。在當次檢驗中，於 94 個樣品中發現 13 件殘留有有機氯農藥，殘留濃度從 6~2270 ppb。其中 10 個樣品驗出殘留蟲必死濃度在 0.1~0.6 ppm、7 個樣品殘留有飛佈達濃度約 0.03 ppm、7 個樣品中殘留安殺番 (endosulfan) 濃度約 0.06 ppm、均超過標準值數倍，另 4 個樣品殘留滴滴涕的濃度約為 3~4 ppb。

此外環境品質文教基金會公佈 2000 年 9 月臺灣大新竹地區魚類的檢測資料顯示，採樣的 30 種市售魚類體內，檢出有機氯農藥殘留的比例高達 47%，其中 13% 含量超出標準。這項研究檢測出含有機氯農藥的魚類共有 14 種，總濃度最高達 1.792 ppm。依各種農藥含量超出標準而言，其中火口魚的有機氯含量，超出澳洲的滴滴涕限量標準；象魚超出聯合國的阿特靈和我國的安殺番限量標準；日本鹹魚超出澳洲的地特靈限量標準，鮭魚也超出澳洲的地特靈限量標準，共有 4 種魚超出限量標準，然而國內目前對持久性有機污染物的相關資料仍相當的有限。另外，大陸地區目前仍在使用部份的有機氯殺蟲劑，其中安特

靈及滴滴涕已禁用，但阿特靈、地特靈、可氣丹及飛佈達及毒殺芬 (toxaphene) 仍未禁用。從上所述，去年國內市售人參一成以上檢出有機氯且殘留量偏高及魚類體內有機氯農藥殘留的比例高達百分之 47%，不合格率 13% 來看，國內有必要針對有機氯污染物做更進一步的檢測，尤其是針對來自大陸的中藥材、農產品及其它食材，以確保國人食用上的安全。

基於上述，有機氯農藥檢測實在為刻不容緩的工作，各國對其國內或周遭環境有機氯農藥的含量越來越重視，不斷的進行環境的檢測以監控有機氯農藥的殘留情形，生物學家也紛紛對現有的物種進行有機氯農藥的生物檢測，以致近年來農藥的分析工作如雨後春筍般地展開，我們將這些分析法分別描述如下：

Ling 和 Huang 利用氣相層析與電子捕捉偵檢器發展出有機氯農藥的偵測<sup>(59)</sup>，電子捕捉偵檢器的感應有選擇性，對於含陰電性的官能基擁有很高的靈敏度，此類官能基包含鹵素、過氧化物及硝基等，因此農藥的偵測具有多樣化的特性。

Schechter<sup>(60)</sup> 為了分析水溶液中滴滴涕類的污染物，研究發展出將滴滴涕衍生化成螢光活性物，並以螢光偵測法定量之。研究中選擇甲氧基滴滴涕 (methoxychlor) 農藥當分析物，讓其與有機螢光染料 Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazine-5-one) 混合，便會生成一複合體且具新的螢光吸收峰於波長等於 663 nm 處 (Nile red)，有別於本來的螢光吸收在波長 605 nm 處，因為極性增強的緣故，此新複合體的螢光吸收强度高，有利於甲氧基滴滴涕的定量，可偵測甲氧基滴滴涕的線性範圍濃度在 1~7  $\mu\text{g/ml}$ 。研究結果中也顯示此偵測法所並不受相似農藥亞(草)脫淨 (6-chloro-N-ethyl-N-isopropyl-1,3,5-triazine-3,4-amine, atrazine)、2,4-D (2,4-dichlorophen oxyacetic acid) 及五氯硝基苯 (pentachloronitrobenzene, PCNB) 干擾的優越選擇性。

其他各式各樣針對不同種類農藥所發展的量測技術不斷地被報導出來，最常使用的方法莫過於氣相層析法和高效能液相層析法等分離技術，配合以不同的偵測系統，來達成農藥定性與定量的分析結果，例如：紫外光與可見光光譜儀 (UV-Vis spectrometer)<sup>(61)</sup>、質譜儀 (mass spectrometer)<sup>(62)</sup>、電子捕捉偵測器、原子放射光譜儀 (atomic emission spectrometer)<sup>(63)</sup> 和電化學偵測器 (electrochemical detector)<sup>(64)</sup> 等，可知目前的有機氯農藥分析方法皆須使用較繁複或昂貴的偵測器，而目前所發展出的電化學偵測器皆有系統不穩定及選擇性差的缺點，所以在有機氯農藥電化學偵測器的開發實在是一門重要的工作。

接著介紹有機磷農藥 (organophosphorus pesticides, OPPs)，它是目前被廣泛使用的農藥，具有強烈刺激性蒜臭味，容易經由腸胃道、呼吸道及皮膚的吸收而造成中毒的現象，有機磷的致毒機轉為抑制乙醯膽鹼酯酶的作用<sup>(65)</sup>，使生物體內的乙醯膽鹼 (acetylcholine) 無法分解成乙醯輔酶 (acetyl-Co-A) 及膽鹼 (choline)，乙醯膽鹼為人體內神經傳導的重要物質，乙醯膽鹼酯酶就是把乙醯膽鹼分解成不具活性的化合物，以避免乙醯膽鹼聚集在神經突觸造成過度刺激或昏迷的中毒症狀。有機磷中毒症狀依時間的不同可分為三種，分別是 (1) 急性毒性、(2) 亞急性毒性及 (3) 慢性毒性，敘述如下：

(1) 急性毒性：暴露於有機磷環境中 12 小時內。產生的作用包括蕁毒作用 (muscarinic effect)：即心搏過慢、低血壓、支氣管痙攣和分泌增加，汗腺、淚腺、唾液腺分泌增加，瞳孔縮小及上吐下瀉等症狀<sup>(66)</sup>。尼古丁作用



(nicotinic effect)：肌肉強烈收縮、心搏過速、血壓上升等症狀<sup>(67)</sup>。中樞神經作用 (CNS effect)：煩躁不安、昏迷暈眩、暈動失調等症狀。

(2) 亞急性毒性：中毒後 1～4 天發生，主要症狀有頸部肌肉及四肢無力，腦神經有可能受到傷害。

(3) 慢性毒性 (遲發性神經病變)：暴露於有機磷環境中 8～14 天後，主要症狀為下肢對稱性麻痺、肌肉疼痛並且全身無力。

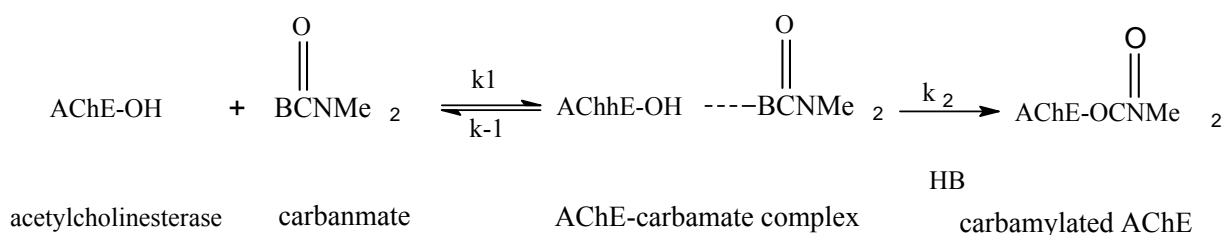
由於有機磷農藥對環境及人體較不易造成累積性的傷害，使其被廣泛且大量的使用，但有機磷農藥所具有的高毒性特質卻不容忽視，除了遵照安全規定使用以外，最重要的是發展一個簡易且精確的分析方法來檢驗食物中殘留農藥之含量，才能夠為自己的健康把關。

Hamers<sup>(68)</sup> 等人利用化學發光現象能偵測數種有機磷系列農藥及氨基甲酸鹽類的農藥，發光的原理是採用 *Vibrio Fischeri* 弧菌作為發光源，並與分析物結合後形成生物發光 (bioluminescence) 系統，並將此技術應用於雨水之真實樣品的偵測上，樣品分析前先採用 HPLC 層析技術將雨水先透過碳 18 管柱來分離，在分離過程中分別使用丙酮 (acetone)、二氯甲烷 (dichloromethane) 及己烷 (hexane) 三種有機溶液沖提，此方法可增加分析的效果並提高鑑別率，唯一的問題是樣品處理過程太繁瑣不符合簡單與迅速分析的要求。

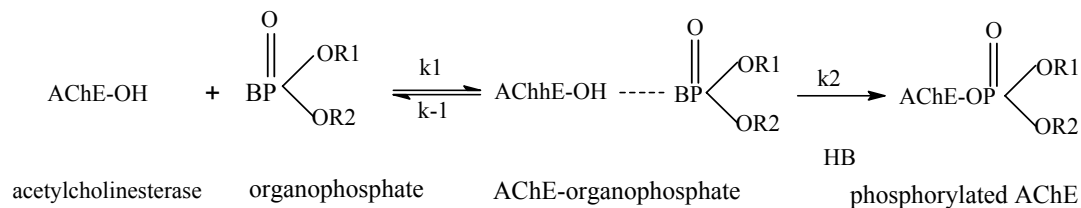
Terreni 等人先利用固相萃取法和氣相層析法分離農藥的混合物<sup>(69)</sup>，再利用原子光譜原理中的氮磷偵檢器 (nitrogen-phosphorus detector) 或稱為熱離子偵檢器 (thermionic detector) 來分析有機磷農藥，這種分析方法對含氮或磷的有機磷系列農藥相當有用，能夠有很高的靈敏度，而環保署對有機磷農藥的標準檢定方法也正是採用這種技術。

Teresa 等人利用 HPLC-ECD 方式偵測對硝基酚 (4-nitrophenol)、4,6-二硝基鄰甲基酚 (4,6-dinitro-o-cresol, DNOC)、甲基巴拉松 (parathion-methyl)、乙基巴拉松 (parathion-ethyl)、撲滅松和 3-甲基對硝基酚 (3-methyl-4-nitrophenol) 六種化合物<sup>(70)</sup>，其中 3-甲基對硝基酚和對硝基酚分別為撲滅松、甲基巴拉松和乙基巴拉松三種農藥的代謝產物，這兩種代謝產物結構相似且具有電活性，因此可以選擇電化學方式進行偵測，實驗的部份分為二階段，第一階段採用庫倫法 (coulometry) 在工作電極上施加電位為 +1.3 V (vs. Ag/AgCl) 七分鐘，將系統中的干擾物清除以利分析物的還原和偵測。第二階段是使用雙工作電極之流注電化學分析系統，利用流注分析系統可以改善電極被毒化的現象，同樣在上游電極施加 -1.3 V 的電位以清除氧氣的干擾，下游電極則施加電位為 +0.7 V 來定量農藥預分析物，此種電化學分析法最大的缺點就是對分析物沒有選擇性，很容易受到干擾物的影響而失去準確性，至於 Martinez 也是利用相同原理偵測撲滅松、甲基巴拉松、乙基巴拉松、Paraoxon (巴拉松之氧化產物) 和谷速松 (guthion) 等五種有機磷類的農藥<sup>(71)</sup>。

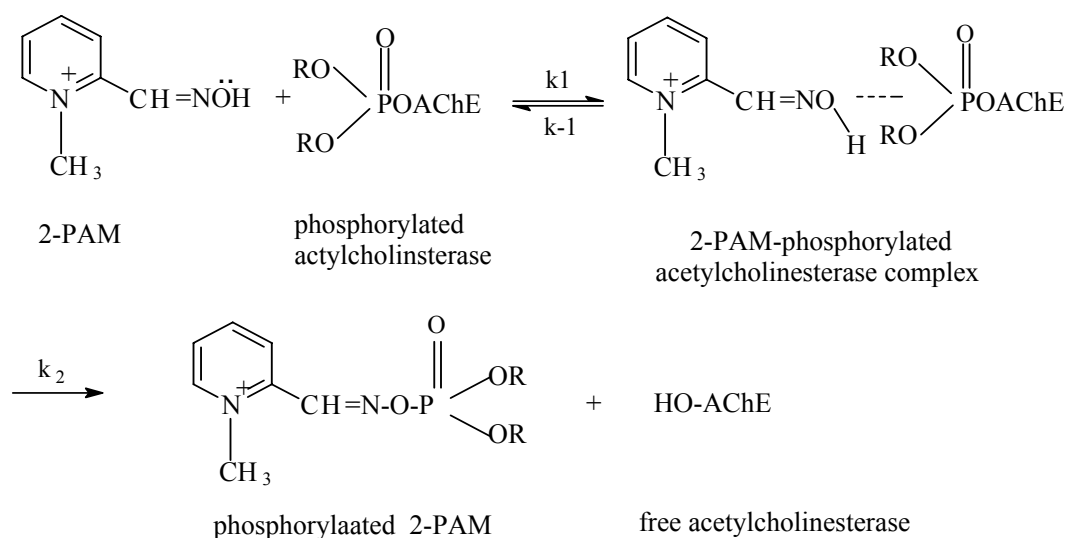
由前人研究得知有機磷及胺基甲酸鹽類農藥皆屬於神經性農藥，因此會抑制神經傳遞元酵素乙醯膽鹼酯的正常代謝，也因此受到醫學界的重視。







在整個抑制的過程當中，可以使用 2-pyrimidine aldoxime methiodide (2-PAM) 來活化遭受抑制之酵素，使得此一系統可以繼續使用。因此利用抑制模式 (inhibition) 測定農藥後，以此試劑可再活化偵測系統之酵素，反應如下：



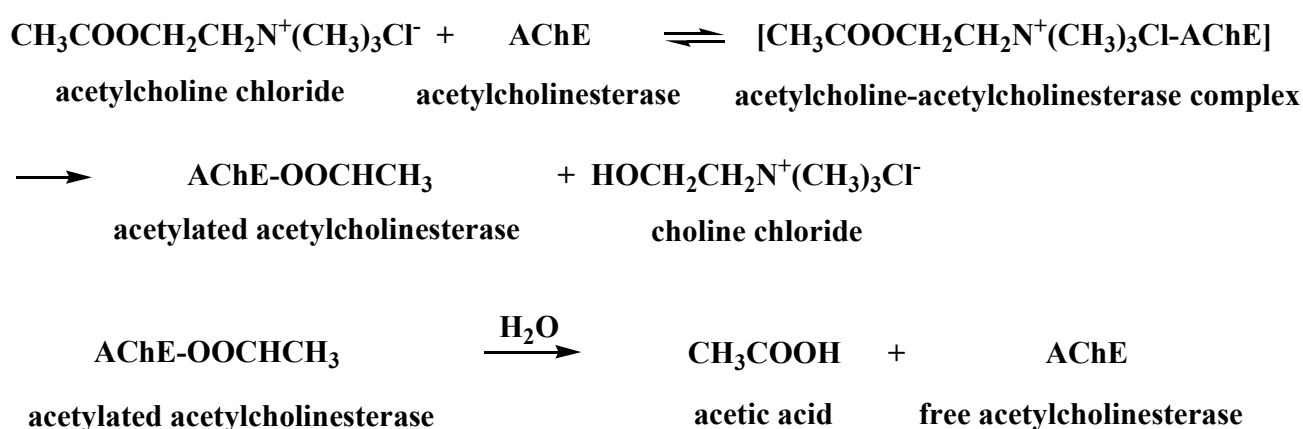
根據上述的原理，早在 1984 年 Durand 及 Thomas<sup>(72)</sup> 便將乙醯膽鹼酯酶固定於碳電極表面，利用有機磷或胺基甲酸鹽類農藥與乙醯膽鹼對酵素的競爭反應引起的抑制作用，藉由偵測訊號的減少而可定量出所加入的農藥含量。利用乙醯膽鹼酯酶來偵測農藥的研究不勝枚舉，1997 年 Mascini 等人將上述機制利用印刷電極 (screen-printed electrode)<sup>(73)</sup> 技術來完成偵測的目的，在 +700 mV 的施加電位，混有 1% 丙烯腈的 pH 9 硼酸鹽 (borate) 緩衝溶液中，測得加保扶 (carbofuran) 的偵測極限為 2 µg/l，研究中也同時做到實際樣品的偵測，其靈敏度比目前所採用的標準方法還要來得好。

1998 年 Lorenzo 等人再將此技術發展至壓電型電極上<sup>(74)</sup>。利用固定在石英晶體微量天平 (quartz crystal microbalance) 表面上的乙醯膽鹼酯酶，製成可偵測有機磷及胺基甲酸鹽類農藥的生物感測器。其原理是利用醋酸吲哚 (3-indolyl acetate) 會被乙醯膽鹼酯酶催化，而在石英面上形成藍紫色的非水溶性染料，因而造成石英震盪頻率的改變。此時若加入這些農藥則會因形成競爭性反應，使得這些藍紫色染料產物的生成量減少，造成訊號的改變。在預濃縮 (preconcentration) 五分鐘後，藉由這種方法可以測得 paroxon 與加保利 (carbaryl) 農藥的線性範

圍各為  $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  及  $1.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ，而二者之偵測極限分別是  $5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$  及  $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 。

Legret<sup>(75)</sup> 等人的研究是將乙醯膽鹼酯酶固定於一可供拋光的含碳環氧 (graphite-epoxy) 樹脂間質中，用來發展安培法之有機磷及胺基甲酸鹽類農藥生化感測器 (biosensor)，在含  $0.1 \text{ M}$  pH 7 之磷酸(phosphate) 及  $0.1 \text{ M}$  氯化鉀 (potassium chloride) 的緩衝溶液下，將上述含碳環氧樹脂修飾電極的電位控制於  $+700 \text{ mV}$  (vs Ag/AgCl)，可得到 Thiocholine 之氧化訊號。但加入有機磷及胺基甲酸鹽類農藥後，發現系統的穩定氧化電流訊號開始緩慢降低，因此可藉由偵測酵素活性的降低，來推算出所加入有機磷及胺基甲酸鹽類農藥的量。

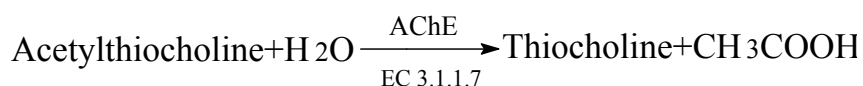
Andres and Narayanaswamy<sup>(76)</sup> 便是透過測量乙醯膽鹼酯酶的活性，來達到偵測有機磷及胺基甲酸鹽類農藥的目的。利用的原理如下：



瑞香酚藍 (thymol blue) 的吸收波長會隨溶液之酸鹼值而改變，為一種隨著酸鹼度不同而改變顏色的染料，當氫離子濃度增加時，瑞香酚藍將由藍綠色轉變為黃色，因此將偵測器之波長定在  $600 \text{ nm}$ ，便可觀測得酵素之活性。因此當有機磷及胺基甲酸鹽類農藥濃度提高時，則酵素對受質的活性便降低，可以藉此得到一反向之訊號，但利用抑制機制之生化感測器都有一共同的缺點，就是偵測的上限濃度受到抑制，無法得到較長之線性範圍。

Barcelo<sup>(77)</sup> 等人則利用酵素乙醯膽鹼酯酶固定在 HPLC 電化學偵測器之玻璃碳工作電極上，並施加  $+410 \text{ mV}$  的電位下，測量酵素反應所生成之產物來顯示酵素之活性，藉此來分析有機磷與胺基甲酸鹽類農藥。其工作原理與前述相同，當有機磷與胺基甲酸鹽類農藥分子進入分析系統時，迅速地與酵素結合並進而抑制酵素對其受質之代謝作用，使得 Thiocholine 的生成濃度降低，在外加  $+410 \text{ mV}$  下，所得的電流隨抑制作用的加強而遞減，因此可以得到濃度對電流的反向曲線圖。

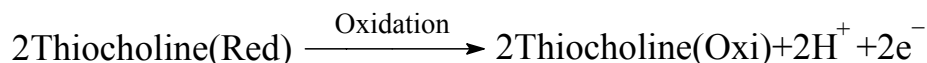
Miquel 等使用印刷修飾電極配合電化學安培法發展出農藥生化感測器<sup>(78)</sup>，這是有機磷類農藥常用的偵測方式，主要的反應機制為有機磷農藥會抑制乙醯膽鹼酯酶的作用，可將 Acetylthiocholine 水解成 Thiocholine，其反應機制如下：



乙醯膽鹼酯酶含量多寡會直接影響反應生成物的 Thiocholine 濃度，所以由 Thiocholine 的濃度可以間接定量有機磷農藥的含量，只是二者之間的關係是成反比，為抑制性的定量偵測法。

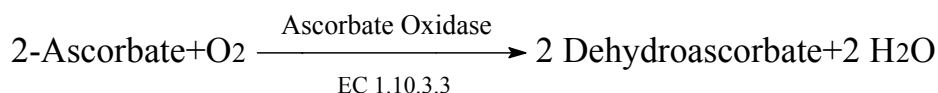
由以下的反應方程式可知，如果利用電化學原理在分析系統中施加氧化電位，就可得到 Thiocholine 的氧化電流訊號，訊號的大小會反比於有機磷農藥的濃度，以此方法就可以定量偵測出有機磷類農藥的濃度。

Miquel 等人之研究正是利用上述原理進行有機磷類農藥的偵測，而他們更



進一步的將電化學三電極系統製作成厚膜 (thick-film) 印刷電極，以進行微小化的快速偵測方式，並針對自來水及果汁樣品作探討。

上述的生化感測器發展皆是利用抑制乙醯膽鹼酯酶的作用來行有機磷農藥的分析，而 Rekha 等也利用有機磷農藥抑制酵素的方法發展出生化感測電極<sup>(79)</sup>，但採用的酵素是抗壞血酸鹽氧化酶 (ascorbate oxidase, EC 1.10.3.3)，有別於一般常見的乙醯膽鹼酯酶，其反應機制如下：



有機磷類的農藥會抑制抗壞血酸鹽氧化酶的活性，降低反應中抗壞血酸鹽 (ascorbate) 轉換成去氫抗壞血酸鹽 (dehydroascorbate) 的比例，以去氫抗壞血酸鹽濃度的變化間接定量農藥的濃度，此方法也可以應用在乙基巴拉松農藥的量測，而響應時間為 120 秒。

Labbe 等人則是利用電聚合 (electropolymerization) 的方法<sup>(80)</sup>，將酪胺酸酵素 (tyrosinase) 與 pyrrole amphiphilic monomer 以電化學沉積的方式，在 0.1 M 過氯酸鉀 (lithium perchlorate) 水溶液中以 +0.75 V (vs. SCE) 的電壓，將酵素沉積在電極表面上。此電極應用來偵測胺基甲酸鹽與亞脫淨農藥時，其偵測極限可達 2 mM 及 4 mM。Everett 和 Rechnitz<sup>(81)</sup> 也利用酪胺酸酵素製成的生化感測器來測量有機磷類農藥。其電極的製法是事先在 1.0 M 氫氧化鈉中，以 +1.5 V 的電壓處理後，再將酵素以醯胺 (amide) 鍵交聯的方式固定在電極表面。完成的電極以 1,2-萘醌-4-磺酸鹽 (1,2-naphthoquinone-4-sulfonate) 當作酵素與電極間之電子傳遞介質 (mediator)，此時若加入有機磷類農藥，會因為農藥參與了競爭酵素的反應位置，使得 1,2-萘醌-4-磺酸鹽氧化後的產物減少，造成電極上測得的電流減小。以計時安培法 (chronoamperometry) 在 -150 mV 下分析大利松 (diazinon) 與二氯松 (dichlorvos) 的濃度，可分別得到 5 μM 與 75 nM 的偵測極限。

目前農藥的生化感測器幾乎都是利用有機磷或氨基甲酸鹽類農藥會抑制酵素活性的特性所發展出來的，這類的生化感測器已經漸漸的採用厚膜印刷電極當作量測的工具<sup>(82)</sup>，厚膜印刷電極具有輕巧、便宜、方便攜帶等特性，若將電化學系統縮小化就能成功的發展出攜帶型農藥偵測器，以方便隨時量測及監控農作物的農藥殘餘量，可讓我們的飲食更有安全保障。但是，抑制作用的選擇性較差，當環境中酸鹼值的改變或有干擾物存在等都會對酵素產生抑制的作用，造成偵測

系統中不穩定因素的來源，要如何改善分析的專一性 (specificity) 是農藥生化感測器所面臨的最大問題。

### 其他農藥及多通道印刷式感測器之研發

隨著印刷製程及微機電 (microelectromechanical system, MEMS) 技術的普及化，將此類已經蓬勃發展的高科技產業技術，結合電子產業背景及化學量測技術，即能夠成功運用於農藥感測器的研發及製程，而截至目前為止，尚未有人發展出利用此類偵測技術實際運用於農藥感測的商品，因此基於此一緣故，發展農藥感測器應極具潛力，且將有助於國內發展新型態的農藥感測器，特別對於農業發展已有相當程度的國內地區，對於農藥發展的相關檢測技術，更需要建立一套完整的微量檢測資料庫，能對於各式農藥樣品進行定量。

而為了能適度運用此類印刷式感測器於市面上農產品農藥殘留量的及時檢測，發展微小化拋棄式之農藥感測器是相當必要的，結合過去，印刷式電極為此類微小化電極的發展趨勢，也有許多文獻對於此微小化製程的電極系統進行實驗室製程的探討，將於後文一併討論。

但由於電化學分析技術具有相當的多變性，應用廣泛，特別以伏安法為最，如吸附剝除法、微差脈衝法，方波脈衝法，以不同的掃描方式改善以伏安法量測時靈敏度欠佳的缺點，而其此主因是電位變化產生的非法拉第電流干擾所引起，諸如此類，電化學方法的各種偵測策略的變化，將使印刷電極能有效運用於微量農藥檢測上；此外，由於伏安法掃描時多以滴加微量分析液樣品於試片後，再行檢測，因此要進行有效的量測，必須配合進行電極的微小化，以適合實際上的量測與應用。而另外的電化學分析技術如電位法、安培法，主要以定電位或定電流的電位元施加方式進行農藥檢測分析，由於系統在機械式攪拌下進行偵測，可以藉由增進質傳模式以提升靈敏度，而另一方面，非攪拌的模式亦能夠完成樣品的偵測，利用階段電位的施加，可以運用於樣品的分析，即可在非攪拌的模式下進行定量分析工作，而此一類技術的結合，更提供了印刷電極在農藥分析上的應用性與多樣性，本實驗也將利用此一便利的偵測系統，進行各種農藥的分析檢測工作，以運用於實際樣品的分析。

過去在印刷電極的製備技術上，起源於 1990 年，在此之前，甚少有出版品或文獻對於此系統進行詳細的製程評估，更甚至於應用在實際電化學的分析檢測上，隨著科技技術蓬勃發展於工業製程的發展，其簡單製備、成本便宜的優點，特別於近幾年來受到重視，而蓬勃發展於電化學感測器的製程上。

在印刷式電化學感測器的發展之初，主要將印刷油墨與無機催化劑共同混和以製備修飾電極，運用於一般環境上的檢測工作，如 Wring<sup>(83)</sup> 等人所發表的以鈷酞青素 (cobalt phthalocyanine, CoPC) 修飾印刷電極進行抗壞血酸 (ascorbic acid) 及麩胱甘肽 (glutathione) 的分析特性評估，於電位 0.3 V (vs. SCE)，磷酸緩衝溶液下進行偵測，其偵測極限分別可達  $5 \times 10^{-8}$  M 及  $1 \times 10^{-7}$  M (S/N=3)，線性範圍達 2 mM 以上，並有小於 6.9% 的變異係數。同時，Hart<sup>(84)</sup> 等人也利用了鈷酞青素為催化劑的印刷電極，對硫化物進行氧化催化的偵測，並發展了以電化學方式偵測 Thiocholine 的農藥感測器，於電位施加在 1.0 V (vs. SCE) 及 pH 8 之磷酸緩衝溶液中進行偵測，其分析的線性可從  $5.0 \times 10^{-7}$  M 到  $4.8 \times 10^{-5}$  M。

Wang<sup>(85)</sup> 等人也發表了一系列拋棄式印刷電極之感測器，分別利用 Ru-CN-Ru 的混價化合物及鈷酞青素作為催化劑，對於聯胺 (hydrazine) 進行偵測，其製程同樣是將催化劑與碳墨先行混和後，印刷於導電底材上完成電極製備，而工作電位的選定，則透過了動態伏安圖 (hydrodynamic voltammogram) 來決定，最後選擇以 1.0 V 及 0.1 V (vs. Ag/AgCl) 為施加電位，而催化劑則分別為 Ru-CN-Ru 及鈷酞青素，對於聯胺作定量分析，以電化學安培法偵測系統下所得的分析特性，其線性皆可到達 0.15 mM，偵測極限約為 5  $\mu$ M，系統重複偵測下所得的相對標準偏差小於 5% 以下，具有不錯的結果。

同樣在環境量測上的應用，而 Wang<sup>(86)</sup> 等人發展出以銱 (iridium, Ir) 和鈱 (ruthenium, Ru) 等重金屬粉末作催化劑，製備於印刷式電極的電化學偵測系統，用來偵測 2,4,6-三硝基甲苯 (2,4,6-trinitrotoluene, TNT)，選擇以較快速、方便的方波伏安法偵測方式進行，選擇用來定量的峰電位為 -450 mV (vs. Ag/AgCl)，在操作環境 pH 6.5 的磷酸緩衝溶液下進行偵測，所得濃度之線性範圍可達 10 ppm，偵測極限為 200 ppb，重複偵測所得之相對標準偏差為 0.6%，運用於實際樣品的檢測時，不受到一般環境干擾物的影響，仍能進行準確的量測。

接著 Wang<sup>(87)</sup> 等人更配合使用了平版印刷式的白金電極，來監控與量測甲醛 (formaldehyde)，偵測系統先於 -0.5 V (vs. Ag/AgCl) 的氫氧化鈉溶液中進行預處理，接著再以 0.0 V 的工作電位下進行偵測，操作環境在酸性溶液及轉速 300 rpm 的條件下，所得線性偵測範圍可達 10 mM ( $R=0.9990$ )，連續量測 20 次所得之標準偏差為 5%，且僅受少數干擾物質如乙醛 (acetaldehyde) 與酚的影響。

而 Park<sup>(88)</sup> 等人也發表了以印刷電極方式來發展重金屬離子感測電極，利用氧化汞 (HgO) 為催化劑，與苯酚樹脂進行混和作為工作電極進行偵測，以陽極吸附剝除伏安法對於銅 (copper)、鉛 (lead) 和鎘 (cadmium) 等重金屬離子進行定量偵測，在施加 -1.2 V 作為吸附電位下，氧化剝除電位分別於 -100、-550 及 -700 mV (vs. Ag/AgCl)，可對環境中的重金屬離子進行分析，線性範圍可達 30 ppb，重複操作下之標準偏差在 4.5% 以下。

在藥物的分析上，Zen<sup>(89)</sup> 等人也利用了內含多種金屬的膠狀黏土與印刷碳墨進行混和，作為工作電極上的催化劑，使用網版印刷技術將電極微小化後進行偵測，分析對象為熊果素 (arbutin)，在利用方波伏安法的掃描下，對於分析物進行偵測。在預處理電位施加 2.0 V 下，定量的峰偵測電位選擇以 +0.35 V (vs. Ag/AgCl)，於 pH 10 的緩衝溶液的環境進行，其結果其分析線性可達 90  $\mu$ M，偵測極限為 0.18  $\mu$ M，在固定分析物濃度進行連續十次量測，變異係數小於 2.08%，為不錯的分析系統。

緊接著在無機催化劑混入印刷碳墨中的技術逐漸成熟之際，開始有研究者將製備好的化學感測器加入酵素或組織於偵測系統中，將整個印刷式電化學感測器發展至生化感測器的應用範疇中，更增廣了其市場上的應用性及實用性，並進一步能夠將電化學偵測系統帶入醫療檢測的領域，能夠與一般大型的醫療檢測用品具有相當的分析特性，並由於容易微小化，更適合使用在居家醫療檢測上，因此在近幾年內，各類型的網印微小化電極便蓬勃發展且應用於各式各樣的檢測上，如 1995 年 Nagata<sup>(90)</sup> 等人利用了雙環戊二烯鐵 (ferrocene) 修飾的葡萄糖生化感測器製備於印刷式的金電極上，並以高分子混和物聚乙炔吡咯銅 (polyvinyl pyrrolidone) 及聚乙炔醇縮丁醛 (polyvinyl butyral) 將酵素修飾於金電極面上的

聚亞醯胺 (polyimide) ，系統於 +0.7 V (vs. Ag/AgCl) 的電位下進行偵測，環境為 pH 6 的磷酸緩衝溶液，所得葡萄糖的線性量測範圍可達 2.0 mM ，此結果並不理想。

另外，Madaras<sup>(91)</sup> 等人使用一些電聚合的高分子薄膜來製造小型可攜式的安培法量測用之生化感測器，用來偵測血漿中的肌酐 (creatinine) ，其製備首先在聚亞醯胺上沈積一層白金或黃金電極層，然後覆蓋一層可避開干擾物的聚 1,3-二胺基苯 (poly(1,3-diaminobenzene)) 高分子薄膜，再利用戊二醛 (glutaraldehyde) 與酵素交聯修飾的特性，固定於電極面上，最後為了避免酵素糾纏在一起，再蓋上一層混和了 poly(2-HEMA) 及 Nafion<sup>®</sup> 的薄膜，完成整個電極的製備。而此一印刷式生化感測器在電位 +0.6V (vs. Ag/AgCl) ， pH 7.4 磷酸緩衝溶液下進行量測，線性範圍為 0.9 ~ 1.2 mM ，偵測極限可達 10  $\mu$ M ，連續操作下之變異係數可達 1.6% ，每一批印刷電極間的變異係數則為 10 ~ 20% ，並幾乎沒有干擾物的產生，生命期也在 30 天以上。

而 Zhang<sup>(92)</sup> 等人也發表了以印刷式電極製備生化感測器的研究，用來偵測葡萄糖及麥芽糖，其製備首先印製探材質的導線部分於聚氯乙烯 (polyvinyl chloride, PVC) 版材上，再印刷參考電極及工作電極部分，最後將催化劑與酵素共同混合並滴加於電極面上，再以印刷技術覆蓋上羥乙基纖維素 (hydroxyethyl cellulose) ，完成整個電極的製備，而整個系統在電化學安培法的量測下，以施加工作電位 0.3V (vs. Ag/AgCl) 進行偵測，並選用 pH 4.8 磷酸緩衝溶液，所得到的葡萄糖量測特性在線性範圍可達 40 mM ，偵測時間 30 秒，連續操作下的變異係數為 3.5% ，而麥芽糖方面，線性範圍可達 15 mM ，偵測時間 60 秒，連續操作下的變異係數為 5.3% ，都具有不錯的分析特性。

而 Evtugyn<sup>(93)</sup> 等人也利用了網版印刷電極技術，進一步來設計生化感測電極，實驗上以抑制酵素活性比例來定量分析物，選擇了有機磷農藥進行分析檢測，在電極的製備上，仍分別以印刷油墨製備所需的三電極系統，再接著將乙醯膽鹼酯酶利用戊二醛共價修飾於電極面，已完成生化感測器的製備，而在偵測上，因為其以抑制型進行量測，先以不含有機磷農藥的 acetylthiocholine iodide 進行量測，由於酵素水解反應，可以在 +400 mV 下量測 thiocholine 的氧化訊號，並訂此訊號為百分之百，而隨著農藥含量逐漸添加，反應被抑制而使得訊號降低，以進行定量檢測工作。而本系統量測的線性範圍在  $5.5 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-7}$  M 間，偵測極限為  $1.5 \times 10^{-7}$  M ，較非抑制型的感測器要差的多，為本系統在應用上的缺點。

瞭解了許多殺蟲劑、殺菌劑及除草劑等各種農藥所造成人類毒害或環境污染的狀況，而這些卻只是一小部分的介紹，因此發展出各式光電化學與電化學檢測系統，以解決農藥濫用造成的負面影響是刻不容緩的，將學習過去的農藥偵測發展的背景，開發各式自動化光暨電化學偵測系統及農藥生化感測器，以因應各類型農藥及環境污染物的偵測，以下將對電激發化學發光技術、生化感測器、化學感測器、脈衝式電極再生技術及自動化流注分析系統做簡述。

## 研究目的

過去的工業發達及現今社會的科技及資訊蓬勃發展，使得利用大量農田耕地以生產足以供給人類食糧的時代，早已不復見，而為了在最小的耕作腹地獲取最

佳之穀物產量及品質，在種植到收割穀物期間，利用各種農藥來避免種類繁多的各式病蟲害、提高農作物產量及生產高附加價值之產品是不可或缺的。在正確且適當的使用各種農藥是且地由於農藥綜觀過去的本研究將利用電激發化學發光與電化學分析技術，開發農藥生化或化學之偵測系統，結合許多技術包括：電激發化學發光、電化學技術、生化及化學感測器以及脈衝再生自動化系統等，來解決種類繁多之農藥偵測上的困難，常見的問題在大部分的農藥是非電活性物種或雖具電活性但卻易在偵測後造成電極的毒化，因此研究中將針對含氮類、醯胺類及酚類等農藥進行分析，配合各種電化學技術的使用，將展現有效解決過去電化學偵測上遭遇的問題，使光暨電化學技術在農藥的分析上更趨彈性及完善。

首先研究以酵素辨識系統來發展農藥的偵測，並試圖發展一分析線性長的農藥生化感測器。研究以醯胺類專一性分解酵素 (Aryl acylamidase, EC 3.5.1.13)，選擇性辨識除草寧農藥，而分解作用後產生的苯胺類物質，配合以拋棄式印刷電極進行定量分析，預期完成的電化學農藥生化感測器將有別於過去抑制型農藥的偵測模式，可有效提高操作濃度的線性範圍及改善農藥分析選擇性的問題。

第二項的研究是利用合適的化學反應前處理，嘗試將不具電活性或易毒化物質做特性的改變，以利電化學農藥分析系統的偵測。研究使用硝酸銻胺之氧化試劑先與 2,4,6-三氯酚反應，生成可逆的苯醌類化合物後，便可在低的電位偵測到 2,4,6-三氯酚農藥的還原，預期將可避免原先利用高氧化電位偵測時，大量環境干擾物嚴重影響分析準確性的窘境，也提供電化學技術在處理複雜的農藥分析時，多一個可思考的維度，藉由化學反應先行衍生化再行偵測，可解決許多農藥分析上所遭遇的問題。

第三項研究將利用自動化技術發展連續式的脈衝電位之電極再生的系統，以解決電化學分析後常發生的電極毒化現象，研究將整合了連續式電壓脈衝產生程式、電位儀和電化學流注分析系統，將開發出可快速且簡易操作的電極毒化再生之分析系統，研究以偵測易毒化電極之乙烯硫脲農藥當目標，將對過去電化學偵測時，操作再現性不佳的問題做改善。

最後將開發非電活性物質之烷基胺類的偵測，利用在溶液環境中穩定性佳的放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，會與烷基胺類作用並產生光訊號的特性，用以開發尼古丁之電激發化學發光農藥分析系統，此系統將兼具螢光分析系統之高靈敏特性和有效解決非電活性農藥偵測問題的優點。且將電激發化學發光農藥分析系統的延伸應用，希望利用此系統發展電化學偵測時會毒化電極的農藥分析物，研究選擇達諾殺作為欲分析之農藥，主要是它們具有經電化學氧化後，易吸附在電極而造成毒化的酚及硫化物的官能團，將利用電激發化學發光農藥分析系統來偵測並解決毒化問題，以有效地拓展電化學分析系統可偵測對象的領域。

綜合上述，本研究旨在拓展過去利用電化學分析農藥上所遭遇的瓶頸，合理的提出各種解決的方法，由偵測技術的改變、分析物的化學反應前處理以衍生化，乃至利用自動化系統等方式來進行，多樣式的手段已成功達到農藥分析系統，簡便、快速、好的選擇性、高靈敏度及高再現性的多項要求，而此研究理念與系統可進一步應用於臨床、藥物及其他環境污染的分析，未來更可將其發展成並可將可攜式之分析儀器，以達到就地或居家檢測的最終目標。

## 第一部分 除草寧農藥生化感測器

### 簡介

生化感測器是這二十年來很熱門分析技術，主要是因為它具有可攜性、快速分析、專一性、方便操作、價格低廉與大量製造等等的多項優點，因此在發展一系列的電化學放光農藥偵測系統後，也希望在農藥生化感測器的發展上有重大的突破。過去已有大量的生化感測器被開發出來，特別是在臨床生理檢驗上，有相當不錯的成果，例如：葡萄糖、尿酸、肌酸酐、膽固醇、神經傳導物質多巴胺等等的生化感測器，皆可達到不錯的實際應用目的。但在環境檢測上的發展就遇到很大的瓶頸，特別在農藥分析這領域，回顧大量的文獻後可發現農藥生化感測器的發展，大部分皆還是利用抑制型的酵素反應機制，也就是許多如有機磷和胺基甲酸鹽類等等的農藥，皆有抑制乙醯膽鹼酶水解乙醯膽鹼反應的效果，以此現象來間接偵測欲分析之農藥，類似此抑制機制也曾有文獻發表利用的是氧化酶酵素。然而上述抑制型的農藥生化感測器常伴隨著許多的問題，如：選擇性不佳、偵測之線性範圍受到作用酵素的限制很顯著，以及乙醯膽鹼的氧化訊號易受到待檢測物質的影響，常造成偵測結果的不準確性。

近來已有部分農藥生化感測器的開發是採正向訊號的模式來偵測，而較著名的是利用有機磷水解酶，將待測的有機磷農藥先行水解後，因產生具電活性的水解產物，所以可順利的直接偵測其氧化電流而定量欲分析農藥，但此類的檢測模式還在發展階段，本研究目標希望也能開發出屬正向訊號之新型農藥生化感測器。

### 除草寧農藥分析的重要性

醯胺類型除草劑被廣泛的應用於農作物，包含稻米、棉花、馬鈴薯、小麥和玉米等等，而除草寧 (3,2-dichloropropioanilide, propanil) 更是醯胺類型除草劑中常被用來控制闊葉煙草類雜草<sup>(94)</sup> (broadleaf weed) 生長的常用農藥，有70~100% 的農作物每年每公頃需噴灑 3.4 到 6.7 公斤<sup>(95)</sup> 來控制雜草的生長，所以避免不了除草寧農藥會在灌溉水、農田土壤中存在，甚至人們食用的稻米、奶製品和蔬果等等，也一定會有它的殘留，因此有進一步監控它的必要性。

除草寧對鼠類之動物實驗顯示它的急毒性半致死量大於  $LD_{50} = 2500$  mg/kg，在美國環境保護署的分類為第三級毒性物質，而NOEL<sup>(96)</sup> (no observed effect level) 為 5 mg/kg/day，動物實驗中發現超過此量會有脾臟腫大的情形，雖然整體來說此除草劑的急毒性並不強，但除草寧及其經由環境代謝產生的副產物，如：二氯苯胺 (3,2-dichloroaniline, 3,2-DCA) 及丙酸 (propionic acid) 等等，已有文獻報導過會造成胸腺 (thymus) 萎縮<sup>(97)</sup> 與氧化紅血球病症<sup>(98)</sup> (methemoglobinemia)，可知其毒性亦不容忽視，因此引起本研究分析此除草寧農藥的高度興趣，研究希望發展出實用之除草寧農藥生化感測器，可提供及時且準確的檢測，已獲取足夠的資料，並有效評估除草寧農藥大量使用後，對環境及人體健康的危害的影響。



## 除草寧農藥的偵測方法

由於除草寧是農作物中的雜草去除常用藥劑，在被大量使用的同時，還是需要注意它對環境與人類的影響，除已知的脾臟、胸腺及氧化紅血球相關疾病外，仍須密切注意它是否也會造成其它的毒害，以避免不必要的負面影響，因此希望能藉除草寧農藥生化感測器的開發，可方便且即刻地瞭解除草寧農藥在環境中殘存狀況，達到有效評估此除草劑毒性的目的。

除草寧存在於食物與環境之中，過去已有需多報導指出它的殘留，而使用的分析方法包括 HPLC-Fluorometry、LC-DAD、GC-MS、GC-MS-MS、GC-ECD 及電化學分析法等等。

Moye<sup>(99)</sup> 和 Miles 利用液相層析法結合光激發螢光的偵測方式分析了大量的含氮類農藥，研究中將農藥大致分為兩大類，以光解後可否與 o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol (OPA-MERC) 反應來區分，光解後可產生一級胺中間產物，便可與 OPA-MERC 生成吲哚類(indole) 之衍生物，有利於螢光強度的增加，另一類則是光解後的產物本身即可進行光激發放螢光的反應，而除草寧便屬此類；樣品經由 HPLC 分離、光解和光激發螢光後對除草寧做定量分析，可達分析之低偵測極限的目標至 0.7 ng，是相當不錯分析的結果。

Barceló<sup>(100)</sup> 和 Ferrer 利用液相層析法結合陣列式二極體(diode-array) 來偵測多種農藥包含除草寧，是針對樣品保存效果佳的冷凍乾燥水樣進行分析，且採用自動化線上固相萃取法 (automated on-line solid-phase extraction) 直接對樣品做前處理，接著以 C18 管柱之液相層析儀來分離樣品中多種的農藥，最後由陣列式二極體接收於 215 nm 波長的吸收值，以定量農藥的含量，此法可分析 1.2~20.5 µg/L 之樣品的濃度。

Natangelo<sup>(101)</sup> 等人利用氣相層析法結合質譜法來發展除草寧等常用農藥的偵測，首先樣品的純化是以固相微萃取法 (solid-phase microextraction, SPME) 做前處理，吸附樣品用的纖維材質是 Carbowax-divinylbenzene，吸附後的樣品分別以氣相層析儀結合四極質譜儀 (quadrupole) 或離子阱串聯質譜儀 (ion trap MS-MS) 進行偵測，分別比較線性濃度 0.1~10 µg/L 及靈敏度，結果顯示直接以四極質譜儀檢測時再現性較佳，而兩者偵測農藥的極限濃度及和樣品分析的回收率，都可符合真實樣品的分析應用。

Begerow<sup>(102)</sup> 等人利用氣相層析法結合質譜、串聯質譜和 ECD 來偵測除草寧等農藥，此法主要是偵測各種取代形式之二氯苯胺(dichloroaniline)，以鑑定具此結構之相關農藥。樣品以酸水解後經蒸汽蒸餾萃取法 (steam distillation extraction) 及液液萃取法進行二氯苯胺的濃縮與純化，經氣相層析後分別以質譜、串聯質譜和 ECD 偵測器來偵測，由上述三種偵測方式的結果得知，可分析的樣品濃度可低至 0.03~0.05 µg/L，樣品回收率分析也可達 93~103%，顯示相當不錯的分析特性，且可應用於人體相關之生化檢驗。

Priyantha<sup>(103)</sup> 和 Weerabahu 發展了一套使用安培法的方式來偵測除草寧，研究中是利用修飾鐵金屬普林類化合物 (5,10,15,20-Tetraphenylporphyrinatoiron(III), Fe(III)TPPCl) 於玻璃碳電極上，作為除草寧分析物還原的催化劑，並可在施加電位 -300 mV 下偵測除草寧的還原，此分析方法的偵測極限為 80 µM (S/N=3)，而此除草寧化學感測器的使用生命期可達七個星期。Oliveira Brett<sup>(104)</sup> 等人則是直接在玻璃碳電極上偵測除草寧的氧化，指出氧化反應<sup>(105)</sup>是發生在醯胺鍵上的氮原子，並於 pH 7.5 之緩衝溶液

中施加 1.27 V 的氧化電位進行除草寧的偵測，可得線性範圍為 0.028~2.9  $\mu\text{M}$  ( $r=0.998$ )。

上述的分析方法在以質譜及螢光法方面，有前處理步驟繁複及儀器昂貴等問題，而過去的電化學分析則有選擇性不佳和未達微小化即可攜性的目標，因此本研究的目的是在開發一套具選擇性、靈敏度高、便利且為可攜性之除草寧生化電化學感測器。而從除草寧的分子結構來看，其具有醯胺基、苯胺及丙酸等構造，以電活性及選擇性的考量，希望能找到可選擇性分解除草寧分子的特異性酵素，並可偵測其分解後的產物，由此觀點出發，從文獻中得知具專一特性的醯胺鍵水解酵素，即 aryl acylamidase<sup>(106,107)</sup> (E.C. 3.5.1.13)，可有效地將除草寧水解成苯胺及丙酸，因此可利用電化學氧化模式，來偵測分解後之苯胺，預期可將之發展成除草寧農藥生化感測器，並應用於測量環境水樣中之除草寧農藥殘的留量，以作為評估此農藥的泛用對環境及人類的影響。

## 實驗部分

### 儀器

本實驗使用之儀器設備，主要包含提供電極試片 (strip) 三電極系統施加電位操作平台的電化學分析儀 (CH Instruments Model 750A, Texas, USA)，提供實驗測量中所使用的微差脈衝循環伏安法 (differential pulse voltammetry, DPV)，並可以用來進行反應機制的探討。感測電極試片印製使用半自動厚膜印刷機 (SMTECH 100S/100MV, MPM, UK)、SMT 印刷銅板 (Faithful Printing Equipment, Taiwan) 來製造。

實驗中精密微量溶液體積則是 10-100、20-200、100-1000、500-2500、500-5000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Eppendorf varipette 4810, Hamburg, Germany) 及 1-5 mL 吸量管 (Jencons, Jencons Sealpette, PA, USA) 來分別量測。溶液酸鹼度值則是利用 pH meter (Sun-tex, SP-701, Taiwan) 進行量測；而藥品重量的量測上，以微量天秤 (Mettler, AE-200S, Greifensee, Switzerland) 秤取藥品，可精確秤量至 1.0 mg。

其他儀器包括循環恆溫槽 (B402, Firstek, Taiwan) 控制測量分析物時樣品溶液之溫度、紫外光可見光光譜儀 UV-VIS (UV1601, Shimadzu, Japan)、加熱攪拌器 (721P, Dataplat, USA)、烘箱 (RUO-602, Risen, Taiwan)、循環恆溫培養箱 (LT-159, Shincan, Taiwan)、三用電表 (75 series II multimeter, John Fluke MFG., USA) 等。

### 藥品

本實驗中水溶液的配製皆使用二次去離子之超純水，包含逆滲透系統 Easypure RO (Barnstead/Thermolyne, IW, USA) 和提供試藥級之水系統 Easypure UV/UF，具備 0.2 $\mu\text{m}$  的細菌過濾膜。實驗中使用的所有藥品皆為試藥級，包括分析之標準物除草寧 (Propanil, 3,2-dichloropropioanilide) 購自 Chem Service (PA, USA)，除草寧 (0.2 mM/0.1% ethanol/water) 標準貯存溶液以棕色瓶保存，並每天新鮮配置；而專一性辨識除草寧農藥之 Aryl acylamidase (AAA, EC 3.5.1.13) 是由 pseudomonas fluorescens 純化而來，供應商是 Sigma Chem. Co.,

USA (Missouri, USA) 。實驗中選用的緩衝溶液有檸檬酸 (3-hydroxytricarballic acid, Citric acid) 、咪唑 (1,3-diazole, Imidazole) 、磷酸氫鈉 (di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate, phosphate) 和 磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate) 購自 Riedel-deHaën (Seelze, Germany) ，而 N-2-羥乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸 (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid, Hepes) 及胺基甲烷三甲醇 (tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 購自 Mallinckrodt (Kentucky, USA) 。

印刷電極所使用的材料包括：調整碳墨黏稠度之環己酮 (cyclohexanone) 購自 Nacalai Tesque 公司 (Kyoto, Japan) 、而印刷電極的底材是 PP 合成紙 (Nan Ya Plastics, Taiwan) 、工作及輔助電極為導電碳墨 (Electrodag PF407C, Acheson, MI, USA) 、參考電極材料是導電銀/氯化銀膠 (C71105R5, Gwent Electronic Materials, UK) 及控制工作電極面積與限定樣品溶液反應範圍的 PU & Epoxy 絕緣膠購自 Cytec (Conap, CE-1171, NY, USA) 。

## 實驗步驟

本實驗之酵素電極試片之製備是以微量吸取器直接取 5 $\mu$ l 之 Aryl acylamidase 酵素溶液 (0.6 units/mL in 0.1 M 磷酸 pH 7) ，並將此酵素溶液滴工作試片上，之後置於 4 $^{\circ}$ C 恆溫冰箱乾燥，經乾燥一小時後即可使用，生化感測器試片即告完成，此工作試片的三電極構造如圖 (1)。偵測待測樣品時，只須將適當體積之樣品溶液，滴在工作試片上與醯胺水解酶作用，再以微差脈衝伏安法進行訊號的擷取，如此可獲得分析物的氧化電流，進而對除草寧農藥行定量檢測。

實驗包括偵測原理的探討及證明，以及可能影響實驗的條件探討，包括酵素的水解除草寧農藥的時間、緩衝溶液酸鹼值的探討、施加電位的探討、溶液流速的探討、樣品迴路體積的探討、緩衝溶液種類的探討、緩衝溶液濃度的探討、分析特性評估。

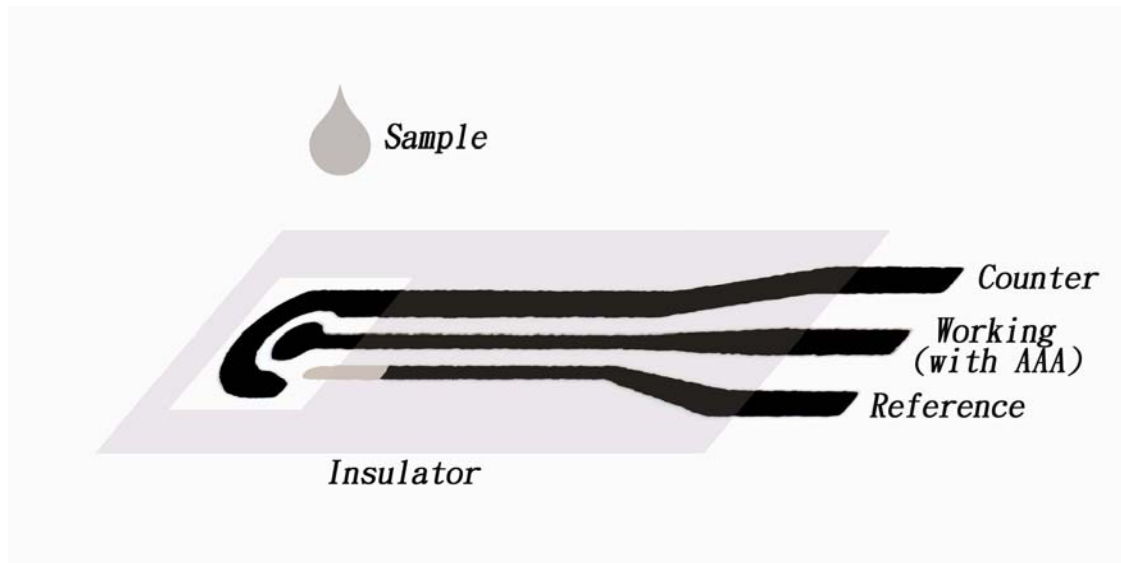


圖 (1) 除草寧農藥生化感測器之印刷電極試片示意圖。

## 結果與討論

### 工作原理的探討

除草寧生化感測器的偵測機制是基於前述文獻中的報導指出，Aryl acylamidase 酵素與除草寧產生水解作用，即醯胺鍵水解酶會針對除草寧的醯胺官能基起作用，而將除草寧分解成苯胺及丙酸之降解產物，如此便可在試片電極上直接測得苯胺的氧化，並間接定量除草寧農藥，其反應機制可簡單表示如圖(2)。

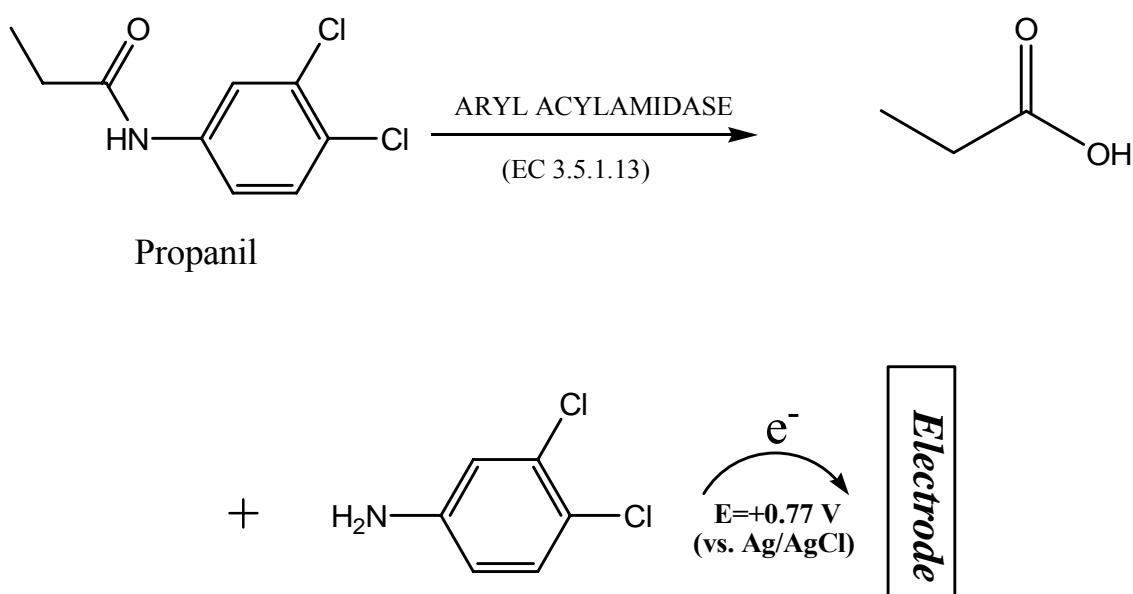


圖 (2) 除草寧生化感測器氧化偵測之反應機制圖。

上述的現象也可由微差脈衝伏安法的實驗中證實，如圖 (3, (a)) 所示，Aryl acylamidase 修飾之印刷電極在除草寧濃度為  $150\ \mu\text{M}$  溶液下，可在電位操作區間  $0 \sim 1.0\ \text{V}$ ，觀察到很明顯的氧化訊號峰，大約在  $0.77\ \text{V}$  (vs. Ag/AgCl) 處，這和苯胺的氧化電位相近（結果未附），而未含除草寧的分析溶液見圖 (3, (b))，則無此顯著的氧化電流，圖中之微小氧化電流經實驗證實得知是 Aryl acylamidase 修飾之印刷電極本身的背景電流。圖 (3, (c)) 則是未修飾酵素之印刷電極上偵測  $150\ \mu\text{M}$  除草寧之微差脈衝伏安圖，可明確的知道在本系統之操作條件下，除草寧農藥在氧化施加電位小於  $1.0\ \text{V}$  下，並不具任何的電活性，但經 Aryl acylamidase 分解後，則可獲得靈敏的氧化訊號，有利於定量分析除草寧農藥。上述實驗是在  $0.1\ \text{M}$  pH 7.0 磷酸緩衝溶液、掃描速率為  $50\ \text{mV/sec}$  及酵素反應作用時間為  $60\ \text{sec}$  下完成的。

由於本偵測方法具有酵素的專一辨識特性且電化學微差脈衝伏安法也可增加對分析物種的選擇性，因此可知此除草寧生化感測器分析時的干擾問題，將可比傳統的除草寧電化學分析方法來的準確。

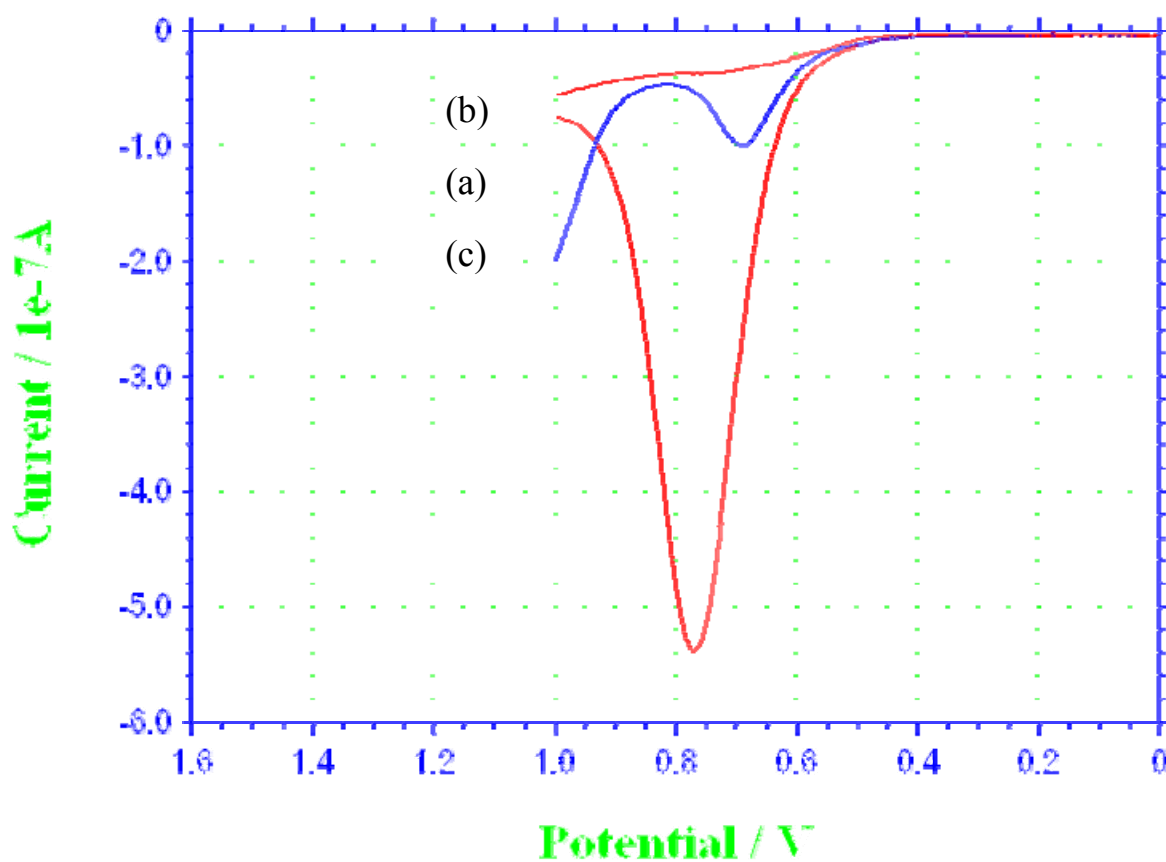


圖 (2) 除草寧/aryl acylamidase 之微差脈衝伏安圖。分別取 15  $\mu\text{L}$  除草寧溶液其濃度為 (a) 150 和 (b) 0  $\mu\text{M}$ ，滴於 Aryl acylamidase 酵素修飾 ( $3 \times 10^{-3}$  units/strip) 之印刷電極上，偵測其氧化訊號之微差脈衝伏安圖；圖 (c) 則是未修飾酵素之印刷電極上偵測 150  $\mu\text{M}$  除草寧的微差脈衝伏安圖，其它操作條件：0.1 M pH 7.0 磷酸緩衝溶液，電位區間 0 ~ 1.0 V，而掃描速率為 50 mV/s。

## 最佳化條件的探討

本研究在建立除草寧農藥生化感測器，研究中使用 Aryl acylamidase 之除草寧分解酵素作為辨識元，除草寧的降解產物為二氯苯胺，結合印刷電極以電化學技術，可偵測其氧化訊號，並用來定量樣品中的除草寧農藥含量。為使除草寧農藥生化感測器，在較佳的環境下操作，研究探討了會影響偵測特性之條件，包括：除草寧經由 Aryl acylamidase 降解的酵素反應時間，分析時樣品緩衝溶液酸鹼度的探討、緩衝溶液種類的探討、緩衝溶液濃度的探討等等，在尋得較佳的偵測條件下操作，將獲取最佳的分析結果。

## 酵素反應時間的探討

本研究中的電化學氧化訊號來自 Aryl acylamidase 酵素與除草寧的反應產物，即二氯甲苯行氧化而產生電流，因此訊號的靈敏度與酵素代謝出的產物量有絕對的關係，而實驗中酵素因事先固定印刷電極上，與其作用的除草寧分析樣品在偵測時才加入，因此需考慮兩者共存之反應時間，此與產生的二氯甲苯的量成正比。由酵素反應時間探討的實驗中得知，如圖 (4) 所示，研究的酵素反應為 10、30、60、90、120 及 180 秒，結果顯示酵素反應時間不足時，如圖中之反應時間低於 30 秒，由於除草寧降解出的二氯甲苯有限，使得訊號隨反應時間減少而訊號劇減。而如圖中顯示在 60 秒的酵素反應時間後，氧化電流以趨緩慢增加，表示此作用時間已近進行了充分的酵素反應，在考量合適的訊號靈敏度及每次偵測所需時間後，選擇以 60 秒為最適化操作條件。



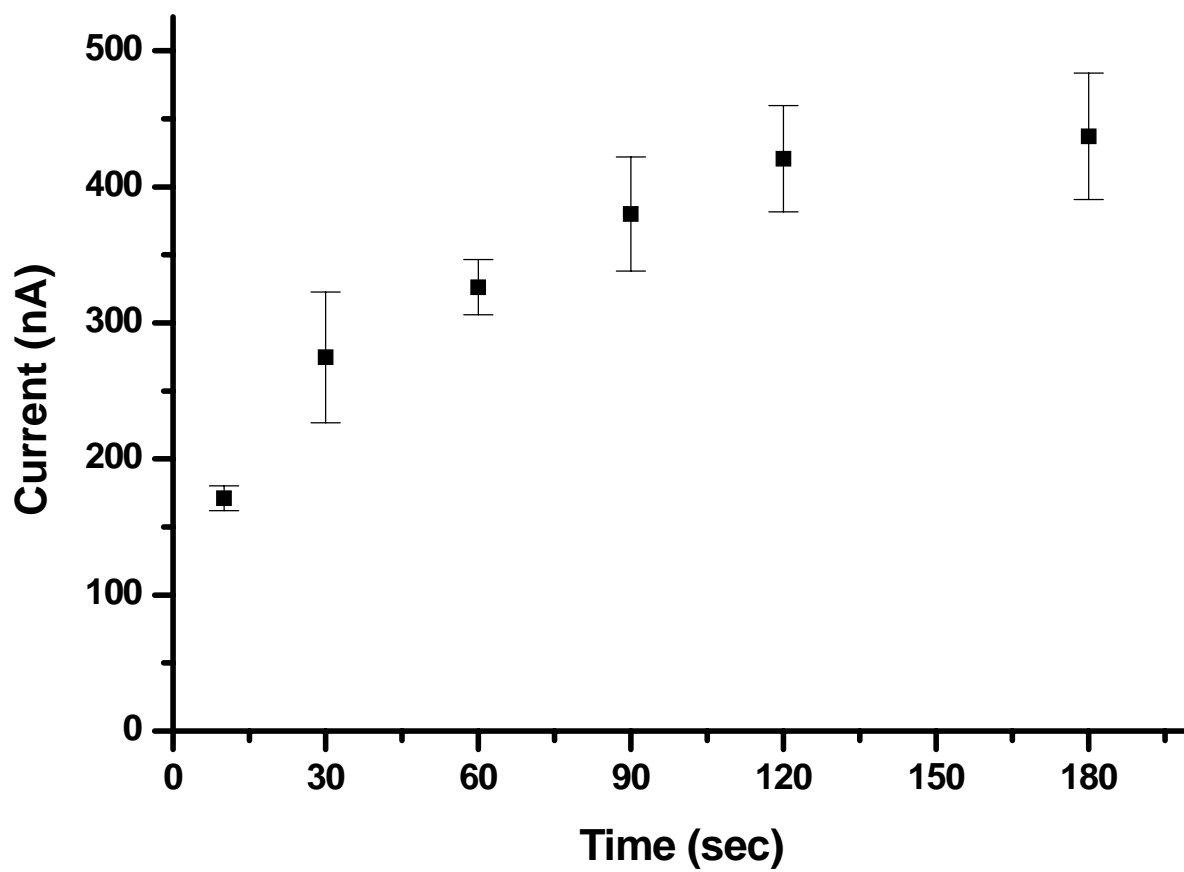


圖 (3) 除草寧與 Aryl acylamidase 酵素之反應時間探討。研究 AAA 酵素分解除草寧的最佳操作時間，反應時間範圍在 10~180 秒間，而其餘操作條件同圖 (3)。

## 溶液酸鹼度的探討

由前述之工作原理得知本實驗所偵測的氧化電流來自二氯苯胺，可推測其氧化反應將與溶液中的氫離子濃度有關，因為二氯苯胺的氧化將涉及電子的失去並同時伴隨氫離子的離去，預期鹼性緩衝溶液會較有利，但本研究中又牽涉除草寧與 Aryl acylamidase 的酵素反應，而酵素通常不利於在太酸或太鹼的溶液下操作，否則酵素中的蛋白質三級結構將遭受破壞，將喪失穩定性及酵素活性，可判斷知溶液酸鹼度對除草寧生化感測器的影響甚劇。因此研究選擇了酸鹼值為 pH 4、5、6、7、8 及 9 的 0.1 M 磷酸緩衝溶液，作為除草寧生化感測器的操作溶液，所得結果如圖 (5) 所示，在較酸的溶液酸鹼度下，如 pH 4~6 間之氧化訊號相對於鹼性溶液小了很多，這結果相當符合上述預期，因為溶液環境同時不利於酵素的穩定及降解產物二氯苯胺的氧化進行；反觀在較鹼性的溶液環境下，可得較靈敏的氧化電流訊號，其原因便是反應溶液中氫離子濃度隨 pH 增加而成對數量減少，讓二氯苯胺的氧化可順利的進行，然而圖中的氧化訊號在溶液酸鹼值超過 pH 7 落在 pH 8~9 時，氧化訊號又再度變小，推論應是較鹼溶液也有造成 Aryl acylamidase 酵素活性降低的疑慮，所以研究最後選擇訊號靈敏度佳之中性磷酸緩衝溶液 pH 7.0 為最佳條件，並以此酸鹼度之緩衝溶液做後續的實驗條件探討。

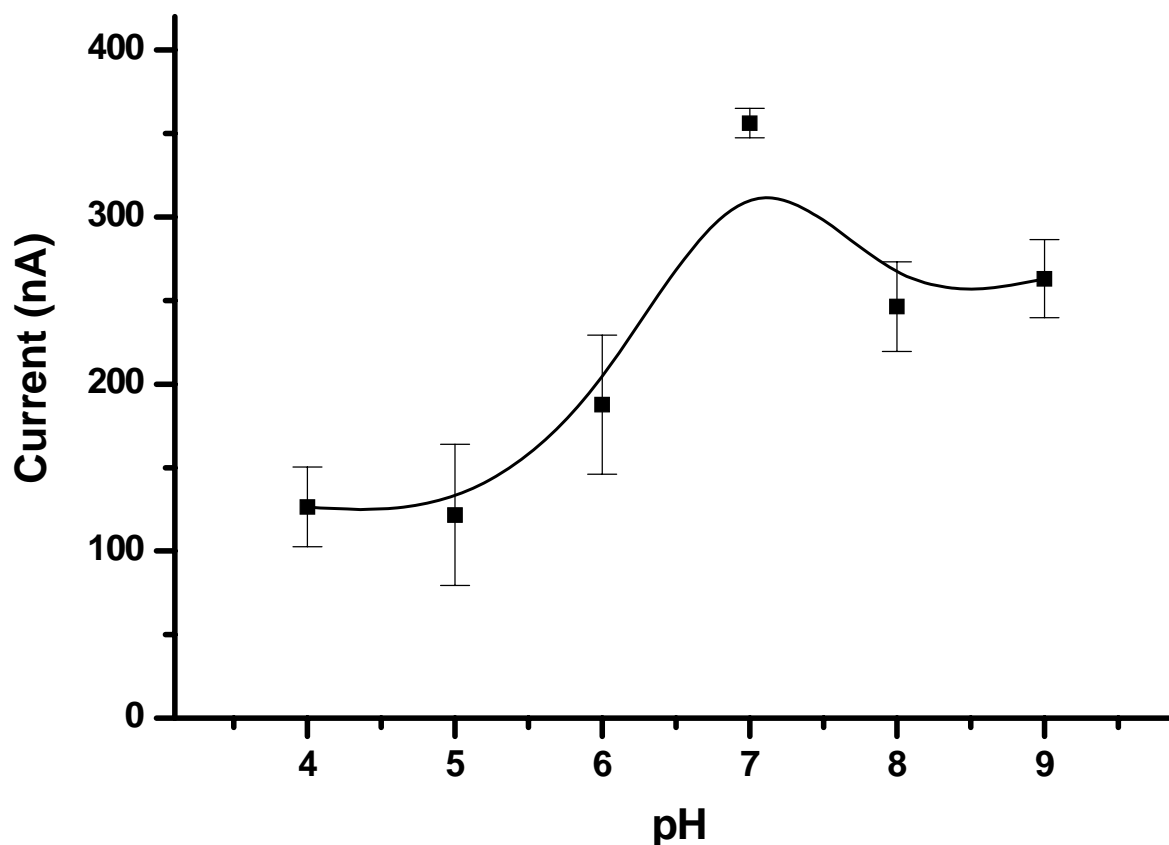


圖 (4) 緩衝溶液之酸鹼值的探討。圖中顯示了除草寧生化感測器在酸鹼度為 pH 4 ~ 9 的反應溶液操作下，所得到的氧化電流訊號。除草寧與酵素的作用時間為 60 秒，其餘條件如圖 (4) 所示。

#### 緩衝溶液之電解質種類的探討

選擇適合的緩衝溶液酸鹼度 pH 7 後，研究針對在 pH 7 有緩衝能力的溶液來探討電解質種類的不同，是否會對操作系統造成影響，因為在生化感測器的偵測系統，電解質除了輔助離子在溶液中可順利的移動，並完成氧化還原電子的傳遞，它常常也會與酵素進行反應，甚至對酵素產生抑制 (inhibition) 的作用，而干擾偵測系統的靈敏度及正確性。因此實驗選擇了酸鹼值在 pH 7 具有良好緩衝能力的不同種類電解質做研究，使用了 Phosphate、Imidazole、Citric acid、Hepes 和 Tris 等五種緩衝溶液來進行最佳化的探討，於圖 (6) 中可觀察到使用磷酸緩衝溶液下操作實驗時，所得氧化電流訊號最大，實驗最後選擇對系統具最佳穩定性及靈敏度的磷酸緩衝溶液為最佳操作條件。

### 磷酸緩衝溶液濃度之探討

至此要探討的是緩衝溶液中電解質的濃度，因為電解質濃度的改變也會產生不同的離子強度及活性，使得氧化還原反應時，電子與離子間電流的傳遞效果也有不同，進而影響偵測的結果。本實驗分別對 0.01 、 0.025 、 0.05 、 0.10 、 0.15 及 0.2 M 等六種不同濃度的磷酸緩衝溶液做探討，在圖 (7) 之結果觀察發現濃度低於 0.05 M 時，訊號靈敏度明顯變小，而在濃度為 0.05 M 後，電訊號趨於平緩，原因可能是電解質濃度變低時，溶液中的離子導電性不佳，使電子傳遞效果變差，因此最後選擇較具緩衝力且訊號靈敏度佳的 0.05 M 磷酸溶液作為最後之操作環境。

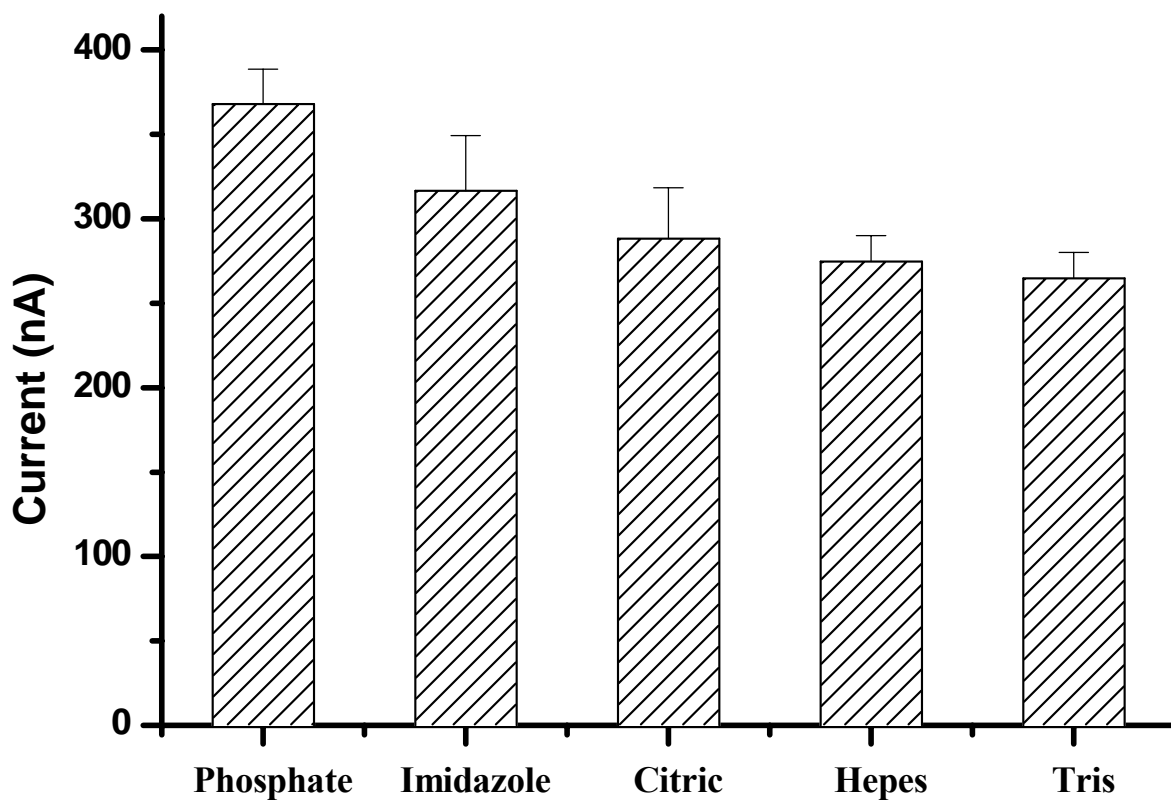


圖 (5) 緩衝溶液電解質種類的探討。除草寧生化感測器之電解質探討，分別選擇了 Phosphate、Imidazole、Citric acid、Hepes 和 Tris 等電解質做研究，而緩衝溶液酸鹼值為 pH 7，其餘條件如圖 (5) 所示。

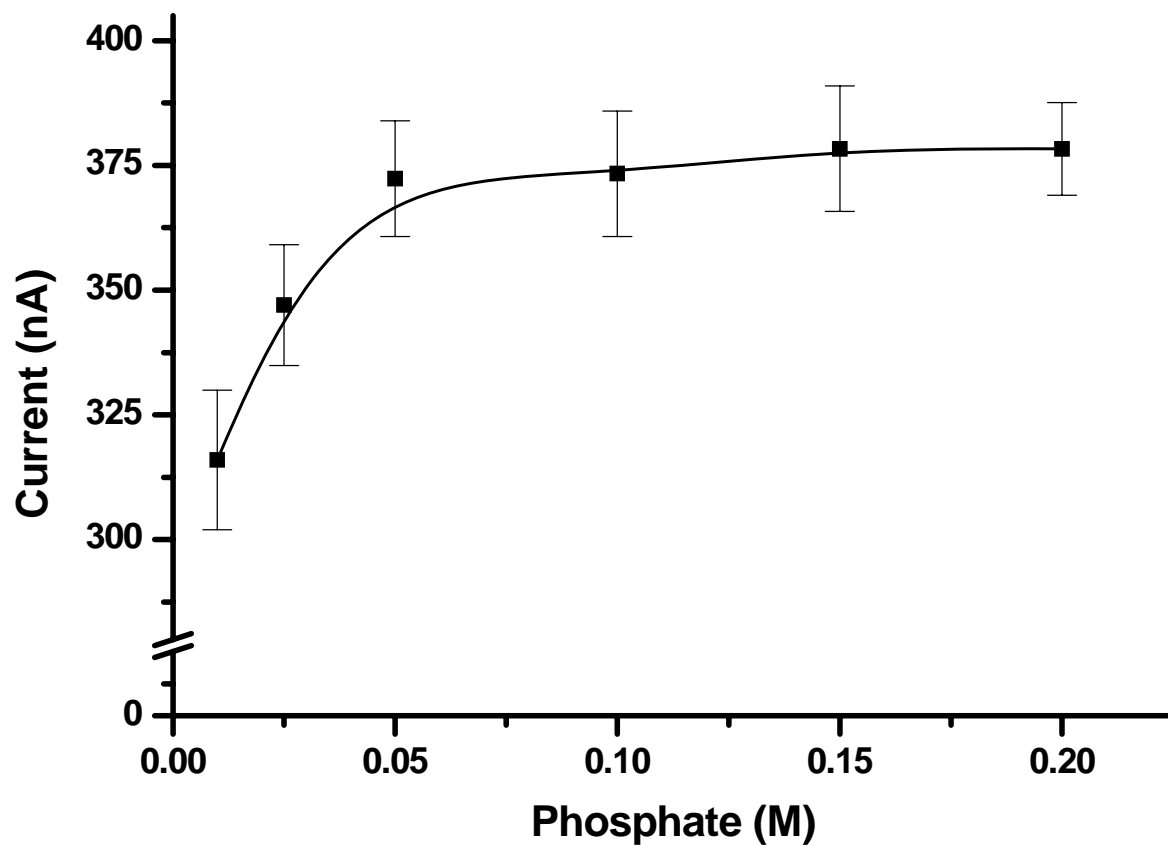


圖 (6) 磷酸緩衝溶液濃度的探討。除草寧生化感測器之磷酸鹽緩衝溶液濃度的探討，選擇的磷酸溶液濃度在 0.01 ~ 0.2 M 區間，研究電解質濃度對氧化電流訊號的影響。其餘條件如圖 (6) 所示。

至此已探討完除草寧生化感測器的各項操作參數，包括：Aryl acylamidase 酵素的反應時間，緩衝溶液酸鹼度、緩衝溶液電解質種類、緩衝溶液濃度等等，其最佳化結果整理如表 (1) 所示，並在系統之最佳化條件下，研究本偵測裝置的各項分析特性，如生化感測器之濃度校正曲線、偵測極限之濃度和系統之操作分析再現性等等，將於下節中繼續做進一步的探究。

表 (1) 除草寧生化感測器之最佳化操作條件

最適化參數	最佳化結果
電位操作區間	0.0 ~ 1.0 V
掃描速率	50 mV/sec
AAA 酵素反應時間	60 sec
溶液酸鹼值	pH 7.0
緩衝溶液種類	磷酸
緩衝溶液濃度	0.05 M

## 分析特性的探討

本研究已針對可能影響除草寧生化感測器的操作參數，做了詳盡的探討，將繼續在研究而得之最適化條件下：即微差脈衝伏安法的氧化操作電位區間  $0.0 \sim 1.0 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$ 、 $0.05 \text{ M}$  磷酸  $\text{pH } 7$  之樣品緩衝溶液、分析樣品體積為  $15 \mu\text{L}$ 、酵素反應時間為  $60$  秒下，探討此農藥生化感測器的分析特性，需得知的結果包含分析工作曲線、系統偵測靈敏度、分析之再現穩定性以及偵測極限濃度等等。

除草寧農藥生化感測器偵測系統，在最佳化操作條件下，分析除草寧農藥，所得的除草寧濃度工作曲線如圖 (8)，其偵測濃度範圍是  $20 \sim 400 \mu\text{M}$ ，每個濃度分別偵測三次，結果顯示測量除草寧濃度達  $400 \mu\text{M}$  時，其濃度與氧化電流訊號還是有相當的線性關係，相關係數為  $0.9990$  ( $n=8$ )，並可求得此生化感測器系統的靈敏度為  $297 \text{ mA/M}\cdot\text{cm}^2$ ；且進一步的實驗在連續  $12$  次測量  $100 \mu\text{M}$  除草寧時，可獲得不錯之操作再現性，相對標準偏差為  $4.03\%$ ，而系統的最低偵測濃度可達  $2.52 \mu\text{M}$  ( $S/N=3$ )，上述結果整理後如表 (2) 所示，可知本研究已成功地發展出一套便利之除草寧農藥生化感測器偵測系統。



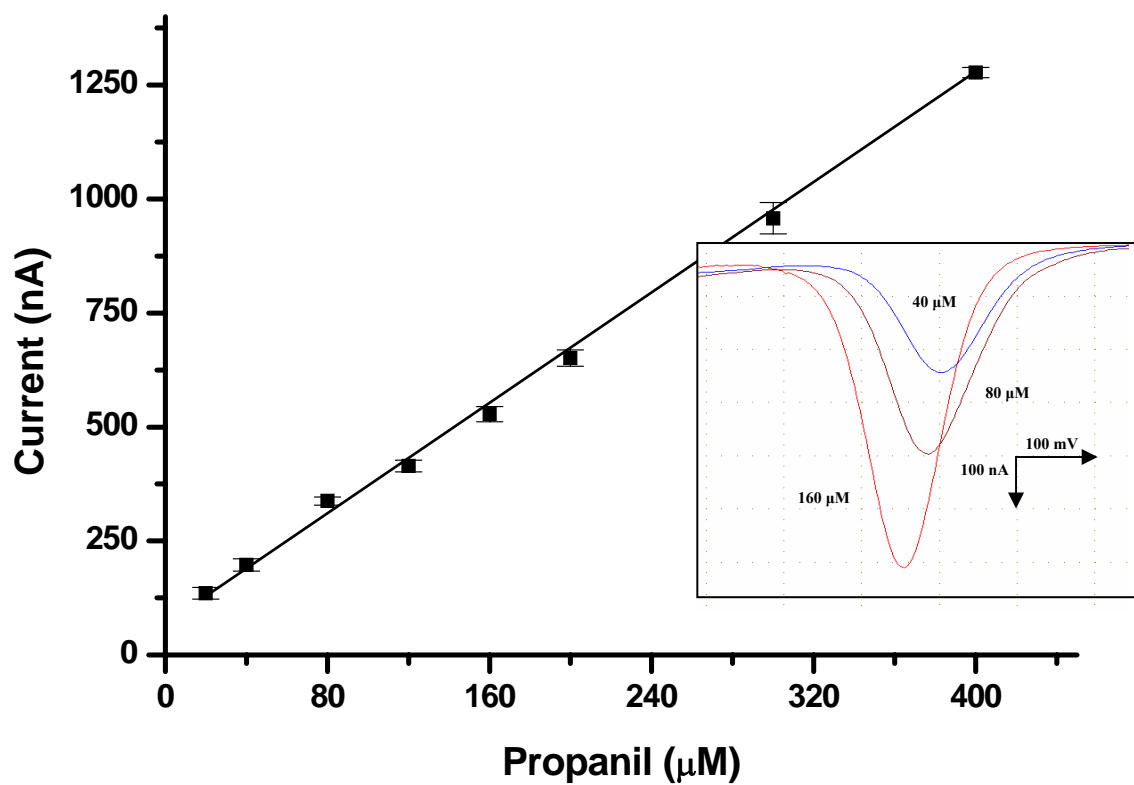


圖 (7) 除草寧之濃度校正曲線。除草寧農藥生化感測器在 0.05 M, pH 7 之磷酸緩衝溶液下、酵素反應時間為 60 秒，連續測量除草寧濃度在 20 ~ 400  $\mu\text{M}$  間所得的氧化電流訊號響應圖，其餘條件如圖 (3)。

表 (2) 除草寧農藥生化感測器之分析特性

分析特性	結果
濃度線性範圍	20 ~ 400 $\mu\text{M}$
分析靈敏度	297 $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$
操作再現性	4.03% (N=12)
偵測極限濃度	2.52 $\mu\text{M}$ (S/N=3)
酵素反應時間	60 sec

## 結論

本實驗已成功發展出除草寧農藥生化感測器，由上述的研究成果得知，本系統具有許多傳統電化學方式偵測除草寧農藥達不到的優點，如除草寧偵測濃度之線性範圍長，在  $20 \sim 400 \mu\text{M}$  間的線性相關係數還高達  $0.9990$  ( $n=8$ )，成功解決了過去抑制型農藥生化感測器所遭遇的瓶頸；而本研究採拋棄式印刷電極試片的感測模式，也改善了檢測上使用層析或質譜分析法上的操作繁複及儀器昂貴等問題；另外，此農藥生化感測器的可攜性及偵測時間短（酵素作用時間為  $60$  秒）之優點，可達成農藥快速檢測與及時分析的好處，將有效提高農藥分析的時效性；同時分析結果還顯示本除草寧農藥生化感測器，具有不錯的操作再現性 ( $4.03\%$ ,  $n=12$ )、低的偵測極限濃度 ( $2.52 \mu\text{M}$ ,  $S/N=3$ ) 及良好的分析靈敏度 ( $297 \text{ mA/M}\cdot\text{cm}^2$ )，兼具上述的多項優點，可確定本研究開發之除草寧生化感測器有其應用價值。

目前系統之酵素修飾及其來源是需進一步考慮的問題，因為其修飾的方式是將 AAA 酵素溶液直接滴於試片並乾燥後而得，製作方式相當便利，但實驗得知此固定法的酵素生命期約只有兩星期，在將來的應用上將是個問題，需進一步發展出適合的修飾技術。而目前的酵素來源是由廠商所購得，價格不便宜，應考慮直接培養可購得之菌種或由天然植物等以生物技術的方式大量生產，並研究其特性來延伸酵素生命期，最後將可使此除草寧農藥生化感測器達成實用的目的。

## 第二部分 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統

### 簡介

在第四章介紹完農藥生化感測器後，希望也進行農藥化學偵測系統的開發，這是因為農藥生化感測器固然具有分析專一性的優異特性，但由於農藥的種類繁多，目前已被開發的農藥辨識酵素相當有限，這些農藥辨識酵素都還有活性不佳及取得不易的問題，而且如何延長農藥生化感測器的操作生命期，是需努力的方向。因此在發展除草寧農藥生化感測器後，將發展非酵素反應之農藥化學偵測系統，可針對各種官能基的不同化學結構，選擇適當的反應試劑，進行氧化還原或衍生化反應，再以電化學模式進行量測，如此可解決大量無電活性農藥欲以電化學方式偵測上的困難，並達成篩檢及監控種類繁多之各類農藥使用情形的目的。

農藥偵測系統或農藥感測器過去已被大量開發，許多農藥偵測系統還是採用氣相或液相層析分離並配合各種偵測器來分析，近年來更有許多的農藥偵測改用質譜法來定量，是基於它可分析的農藥種類較廣且選擇性及分析靈敏度高，但由於上述農藥分析系統皆有儀器昂貴及無法及時偵測的缺點。而電化學法的發展有可攜方便性、系統簡單及高靈敏性等等的優點，可有效排除系統操作及維護不易等問題，但過去的電化學農藥偵測系統，常利用高的氧化或還原電位，來偵測欲分析的農藥，常遭遇到環境中易氧化或還原物質的嚴重干擾，普遍有分析選擇性不佳的問題。綜觀所述，在此的研究將發展出干擾性小的低電位電化學農藥偵測系統，提供理想的電化學偵測開發模式，以祈使電化學農藥偵測系統能有進一步的發展。

### 2,4,6-三氯酚農藥分析的重要性

含氯酚類相關化合物的製造是將酚氯化而得，在 1975 年時的統計，每年氯酚類相關產物的產量已達 2 億公斤<sup>(108)</sup> 的量，30 年後的今天，它的使用量及其對環境與人類健康的影響已不言而喻，過去被廣泛製成各種農藥於植物林的保護，其農藥製劑的種類含括殺菌劑、殺蟲劑及在紡織業用來防止發霉的藥劑，由於它已被研究發現有致癌的虞慮，有許多相關的農藥產品已被禁用，然而如用以合成殺菌劑等等的應用還是持續被使用中，因其有致癌的特性，所以監控它的必要性。

2,4,6-三氯酚 (2,4,6-trichlorophenol) 對鼠類之動物實驗顯示它的急毒性半致死量為  $LD_{50} = 820 \text{ mg/kg}$ ，在美國環境保護署的分類為第三級毒性物質，為急毒性不強的農藥，但過去致癌性可能性的動物實驗中，2,4,6-三氯酚卻是被經常研究的對象，且被國際癌症研究組織歸類為 Group 2B<sup>(109)</sup>，也就是對人類的致癌性證據上還不明確，但對動物的致癌性實驗結果是確定的，並已被證實在動物實驗<sup>(110)</sup>中會導致淋巴瘤、血癌、腺腫瘤和肝臟腫瘤等等的嚴重後果可知其毒性亦不容忽視，因此引起本研究分析此 2,4,6-三氯酚農藥的高度興趣，研究希望發展出實用之 2,4,6-三氯酚農藥生化感測器，可提供及時且準確的檢測，已獲取足夠的資料，並有效評估 2,4,6-三氯酚農藥大量使用後，對環境及人體健康的危害的影響。

## 2,4,6-三氯酚農藥的偵測方法

由於 2,4,6-三氯酚是常存在於殺菌劑、殺蟲劑及在紡織業用來防止發霉的藥劑，因此很容易在收成之農作物或人類活動之周遭環境中殘留，且已被報導有造成淋巴瘤、血癌、腺腫瘤和肝臟腫瘤等疾病的可能，為了避免人們在不自知的狀況下受到它的危害，開發各種有應用價值且可及時得知其存在與殘留的情形是需要的。希望開發出 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統，可隨時監控其在食物及環境上的殘存狀況，達到有效防止其毒害的目的。

2,4,6-三氯酚存在於食物與環境之中，過去已有需多報導指出它的殘留，而使用的分析方法包括 GC-ECD、GC-MS、GC-FID、LC-DAD 及電化學分析法等等。

美國環境保護協會 (Environmental protect agency, EPA) 在過去已公告了許多可用來分析水中 2,4,6-三氯酚含量的方法，包含 EPA 604<sup>(111)</sup> 和 8270<sup>(112)</sup>，方法中以 EPA 604 較為靈敏，使用的方法是先反應生成五氟苯基醚 (pentafluorobenzyl ether) 類衍生物後，以氣相層析配合 ECD 偵測器來偵測 2,4,6-三氯酚，其偵測極限可達 0.64  $\mu\text{g/L}$ ，而 EPA 8270 使用的方法是 GC-MS，但其偵測極限濃度較差為 10  $\mu\text{g/L}$ 。

Bartels<sup>(113)</sup> 等人也利用液相層析法結合 ECD 來偵測氯酚類化合物，分析樣品的來源是 10~12 歲的孩童尿液，分別收集 339 人之 24 小時尿液樣品進行分析，所獲得結果主要用來評估居住環境對氯酚類化合物，在人體內殘留的影響。欲分析樣品先經酸水解、蒸餾及固相萃取等處理後，以 GC-ECD 來檢測並與以 GC-MS 的方法作比對，可知有 95% 的尿液樣品中含 2,4,6-三氯酚的濃度約 1.74  $\mu\text{g/L}$ ，而分析 2,4,6-三氯酚偵測極限可低至 15  $\text{ng/L}$ ，有相當好的靈敏度，但分析之前處理步驟繁雜且耗時是其缺點。

Schneider<sup>(114)</sup> 等人同樣利用 GC-ECD 的系統對氯酚類等物質做檢測，目的在發展可即時瞭解生物菌種代謝環境污染物效率的方法。研究是將代謝後之殘留的氯酚類以二氯甲烷萃取後將有機溶劑揮發移除，再以五氟溴化苯進行衍生化後，以 GC-ECD 偵測氯酚類化合物的殘留，此方法可獲得不錯的線性濃度，範圍在 0.10~10  $\text{mg/L}$  之線性相關係數為 0.999 ( $n=12$ )，且分別評估 0.10 及 10  $\text{mg/L}$  的回收率為 101 及 103%，已可有效應用於評估菌種分解氯酚類污染物的效率。

Pawllszyn<sup>(115)</sup> 和 Buchholz 使用的是固相微萃取法 (solid-phase microextraction, SPME) 結合 GC-FID 或 GC-MS 來分析酚類化合物。其中 SPME 的吸附用材料聚甲基矽氧烷 (poly(dimethylsiloxane), PDMS) 纖維 (fiber) 有別於 EPA 604 方法中所用的聚丙烯醯胺類 (polyacrylate) 纖維材料，因此不需使用到有機溶劑即可進行酚類化合物的萃取吸附，可同時解決了污染及耗時的問題，結果得知以 GC-FID 及 GC-MS 偵測 2,4,6-三氯酚濃度的線性範圍分別在 0.05 ~ 5.0 及 0.007 ~ 0.7  $\mu\text{g/mL}$  間，而偵測極限則分別可低至 0.8 及 0.08  $\mu\text{g/L}$ ，且此分析法有良好的操作再現性，RSD 小於 5%。

Jen<sup>(116)</sup> 和 Wei 結合微波輔助萃取法 (microwave-assisted extraction, MAE) 和頂空固相微萃取法 (headspace SPME, HS-SPME) 來決定土壤中的氯酚類化合物。將 MAE 與 HS-SPME 方法結合，在水溶液酸鹼值 pH 2、吸附材料為聚丙烯醯胺纖維及脫附時間三分鐘等條件下，以一個步驟便可方便的萃取吸附土壤樣

品中之氯酚類化合物，接著以 GC-ECD 來偵測，2,4,6-三氯酚的線性範圍 1.0 ~ 25 µg/kg 並可獲得約 90% 的回收率及不錯的分析再現性。

Namieśnik<sup>(117)</sup> 等人以 HPLC-DAD 之偵測系統，可同時決定許多在地表水及海水中的氯酚類等除草劑含量。研究中選擇的多種常存在於水資源中的酚類等除草劑污染物，而 2,4,6-三氯酚是其中的一個分析對象，分析水樣經固相萃取法濃縮萃取後，以逆相管柱 (RP-18) 之 HPLC 系統進行樣品分離，並以 DAD 檢測器來偵測，2,4,6-三氯酚線性範圍在 0.5 ~ 5.0 µg/L ( $R^2=0.9937$ )，偵測極限是 0.25 µg/L (S/N=3)，此分析物的回收率約為 94%。

Luong<sup>(118)</sup> 和 Zhao 利用電催化方式並以安培法來測量氯酚類化合物。以催化氧化試劑硫酸銻 (ceric sulfate) 或 chloroperoxidase 可將氯酚類化合物氧化成苯醌類物質，同時在電極上修飾葡萄糖氧化酶酵素 (glucose oxidase) 及反應溶液中加入葡萄糖，此時苯醌類化合物扮演的是催化葡萄糖氧化酶酵素不斷形成活性之氧化態，而本身則進行還原，如此便可以氧化模式來測定氯酚類待分析物的量，在流注分析系統及 +430 mV (vs. Ag/AgCl) 氧化電位施加下，此方法分析 2,4,6-三氯酚的選擇性及靈敏度最好，可達 1.5 nM。

Yao<sup>(119)</sup> 和 Kotegawa 使用類似上述的反應機制，是利用硫酸銻先將 2,4,6-三氯酚氧化成苯醌類，施加 -150 mV (vs. Ag/AgCl) 之還原電位偵測，再結合蟲漆酶 (laccase) 酵素可逆的將還原後苯醌類循環式的氧化，以獲得訊號放大的效果，此方法的好處是在其偵測電位時干擾較少，且其靈敏度佳，2,4,6-三氯酚的偵測極限可低至 1.2 nM，但其主要缺點是酵素生命期不長，約 90 天後便無酵素活性。利用電化學模式偵測的氯酚類的方法，還有利用催化劑催化氧化的方式，Nyokong<sup>(120)</sup> 和 Mafatle 就利用鈷酞青素等催化劑達到偵測氯酚物的目的，此修飾電極有提高感測器穩定性的效果。

上述的分析方法在以質譜及層析法的應用方面，有著前處理步驟繁複及儀器昂貴等問題，且儀器整體算是龐大，而過去的電化學分析法卻有選擇性不佳或需利用酵素在水溶液中參與反應來進行較靈敏的偵測，增加酵素消耗量且造成偵測系統操控性不佳的問題，因此本研究的目的在開發一套兼具選擇性、靈敏度佳且便利之 2,4,6-三氯酚農藥電化學感測器。而從 2,4,6-三氯酚的分子結構來看，其苯酚官能團是具電化學氧化活性的，但使用電化學系統偵測苯酚物質時，將先遭遇到電極會被苯酚氧化後產生的高分子物質吸附，而使偵測的氧化電流訊號隨偵測而漸漸減小，也就是電化學系統中常見的電極毒化。因此希望能利用化學反應的方式，先將 2,4,6-三氯酚農藥以硝酸銻胺氧化劑反應，再針對其苯醌類氧化後產物進行量測，預期此分析模式已轉變為還原偵測，將可解決原本電化學直接氧化分析的毒化問題，且由於苯醌類物質的還原偵測電位相當低，一併改善了在高氧化電位偵測時，會遭受環境易氧化干擾的問題。

## 實驗部分

### 儀器

本實驗使用之儀器設備，主要包含提供三電極系統施加電位操作平台的電化學分析儀 (CH Instruments Model 750A, Texas, USA)，提供實驗測量中所使用電壓，並以安培法進行分析物的量測，並可以它來作循環伏安法等電化學實驗，另

外在本實驗中也提供作為反應機制探討之用。而電化學三電極反應槽系統來自 BAS (BAS Liquid Chromatography CC-5, Bioanalytical System Inc., West Lafayette, IN, USA) , 包含提供玻璃碳雙工作電極 (glassy carbon dual working electrode, MF-1000) 、參考電極 (reference electrode, RE-6B, Ag/AgCl)與輔助電極 (電化學槽本體之不銹鋼材) 的電化學反應槽、樣品注射裝置和定體積之樣品迴路系統等, 可對於定量注射樣品進行分析; 而注射式幫浦 (syringe pump, 74900-20, Cole-Parmer, USA) 在本系統中是用來穩定推動緩衝溶液到電化學反應槽進行偵測。

實驗中精密微量溶液體積同樣是使用 10 ~ 100 、 20 ~ 200 、 100 ~ 1000 、 500 ~ 2500 、 500 ~ 5000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Eppendorf varipette 4810, Hamburg, Germany) 及 1 ~ 5 mL 吸量管 (Jencons, Jencons Sealpette, PA, USA) 來定量。溶液酸鹼度值則是利用 pH meter (Sun-tex, SP-701, Taiwan) 進行量測; 而藥品重量的量測上, 以微量天秤 (Mettler, AE-200S, Greifensee, Switzerland) 稱取藥品, 可精確稱量至 1.0 mg 。其他儀器包括紫外光可見光光譜儀 (UV1601, Shimadzu, Japan) 、加熱攪拌器 (721P, Dataplat, USA) 、烘箱 (RUO-602, Risen, Taiwan) 及三用電表 (75 series II multimeter , John Fluke MFG., USA) 等。

## 藥品

本實驗中水溶液的配製皆使用二次去離子之超純水, 包含逆滲透系統 Easypure RO (Barnstead/Thermolyne, IW, USA) 和提供試藥級之水系統 Easypure UV/UF , 具備 0.2  $\mu\text{m}$  的細菌過濾膜。實驗中使用的所有藥品皆為試藥級, 包括分析之標準物 2,4,6-三氯酚 (2,4,6-trichlorophenol) 購自 Chem Service (PA, USA) , 2,4,6-三氯酚之貯存溶液為 10 mM 溶於 95% 乙醇中並以棕色瓶保存, 並每天新鮮配置所需之樣品溶液; 而反應所用的氧化劑硝酸銻 (IV) (ammonium cerium(IV) nitrate) , 其供應商是 Riedel-deHaën (Seelze, Germany) 。實驗中選用的緩衝溶液有醋酸 (methanecarboxylic acid, acetic acid) 、檸檬酸 (2-hydroxytricarballic acid, Citric acid) 、磷酸氫鈉 (di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate, phosphate) 和磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate) 購自 Riedel-deHaën (Seelze, Germany) , 而琥珀酸 (1,2-ethanedicarboxylic acid, succinic acid) 購自 Fluka (Buchs, Switzerland) 。而用來評估環境中干擾物的代表物質 SDS 、 Humic acid 及 Camphor 購自於 (Aldrich, Wisconsin, USA) , 而 2,4-二氯酚 (2,4-dichlorophenol) 、 2-氯酚 (2-chlorophenol) 、 酚 (phenol) 、 2,4-二甲基酚 (2,4-dimethylphenol) 及 4-胺基酚 (4-aminophenol) 皆購自 Riedel-deHaën (Seelze, Germany) 。

## 實驗步驟

### 樣品反應前處理

本研究中所欲分析的標準溶液環境水樣, 皆須先經硝酸銻胺的氧化處理, 其步驟是標準溶液或欲分析水樣先加入 5 mM 之硝酸銻胺氧化劑, 劇烈攪拌反應五分鐘後, 加入 0.2 M 磷酸二氫鈉與之充分混合, 此時會產生大量的三價及四

價磷酸鈾沈澱物，再利用離心的方式將沈澱物去除之，而澄清之上層溶液為避免光照，則需以棕色瓶儲存，至此欲分析樣品的前處理即告完成，為避免樣品變質而影響實驗結果，此待分析樣品溶液需每日新鮮配製。

### 電極拋光處理

玻璃碳工作電極以 0.05 及 0.1  $\mu\text{m}$  粒徑的氧化鋁粉進行表面拋光後，置於蒸餾水中以超音波震盪清洗電極表面，並利用循環伏安法掃描鐵氰化鉀標準物，用來檢視電極表面是否清理乾淨，並且在每次進行實驗探討前，先偵測 0.5 mM 2,4,6-三氯酚農藥的還原電流，其訊號為 5% 的誤差內，才開始後續之實驗，提供此最佳的電極表面狀態，以確保偵測系統之可靠性及再現性。

實驗還包括偵測原理的探討及證明，以及可能影響實驗的條件探討，例如：還原偵測之施加電位的探討、溶液流速的探討、樣品迴路體積的探討、緩衝溶液酸鹼值的探討及緩衝溶液種類的探討，此外也將對本研究系統的各項分析特性做詳細的評估。

## 結果與討論

### 工作原理的探討

本章要介紹的是利用化學處理方法，先將可被氧化偵測卻會毒化電極的農藥分析物進行化學反應前處理，藉由適當的化學反應，希望能將易毒化之分析物轉換成氧化還原可逆或具電活性但可連續行偵測的氧化後產物，以利電化學農藥分析系統的開發。本研究分析對象是 2,4,6-三氯酚農藥，首先先以循環伏安法探討其電化學性質，在操作電位區間為 0.4 ~ 1.0 V 間，0.05 M pH 3.0 之磷酸緩衝溶液及 2,4,6-三氯酚農藥濃度 1.0 mM 下，所得循環伏安圖如圖 (9, a) 所示，可觀察到在第一圈的氧化方向掃描過程中，在 +0.65 V (vs. Ag/AgCl) 處有一明顯的氧化訊號峰，但在連續掃描 10 圈後 (如圖 (9, b)，其第十圈的氧化訊號峰已明顯減小，氧化電流只剩原本的 53%，圖 (9, c) 是空白溶液的循環伏安圖，可知電極表面受 2,4,6-三氯酚農藥之氧化後產物給毒化了，而毒化的原因<sup>(121,122)</sup>可能是分析物氧化後，生成聚合高分子或使電極變惰性的物種吸附於玻璃碳表面。



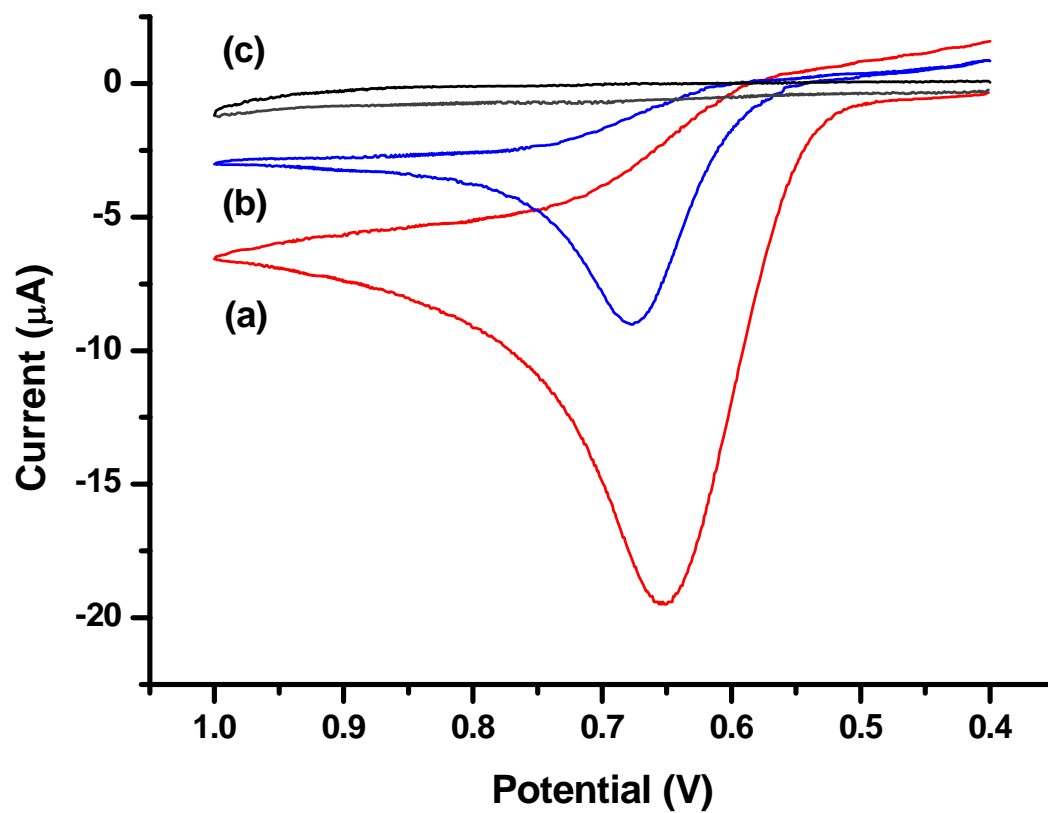


圖 (9) 2,4,6-三氯酚之循環伏安圖。圖中顯示濃度為 1.0 mM 之 2,4,6-三氯酚的第 1 圈 (a) 及第 10 圈 (b) 掃描後伏安圖，而 0.0 mM (c) 即不含 2,4,6-三氯酚之伏安圖。條件：在 0.05 M pH 3.0 之磷酸緩衝溶液及掃描速率 100 mV/s 下操作。

實驗也利用流注分析系統作評估，分別探討經硝酸銻胺氧化處理後以還原偵測 (圖 (10, a)) 及未經處理 (圖 (10, b)) 直接氧化偵測時，所得的訊號再現性表現。當 2,4,6-三氯酚農藥與硝酸銻胺氧化劑反應後，在玻璃碳工作電極上施加 -50 mV (vs. Ag/AgCl) 的電壓時，便可測的明顯的還原電流，在載流液體為 0.05 M, pH 3 磷酸緩衝溶液，流速為 1.0 mL/min，而樣品體積為 20  $\mu$ L 下，連續測量 20 次 0.5 mM 的 2,4,6-三氯酚農藥的還原電流以評估其再現性，其相對標準偏差只有 1.56%。在上述之相同條件下，未經處理的 2,4,6-三氯酚農藥於施加氧化電位 +0.75 V 下，亦連續偵測 20 次 0.5 mM 的 2,4,6-三氯酚農藥，得知毒化的現象很嚴重，在第 20 次的氧化電流已較第一次的偵測訊號小了 71%，結果顯示於圖 (10, b)，由這些現象可充分說明，本研究發展可重複分析 2,4,6-三氯酚農藥之電化學偵測系統的必要性。

2,4,6-三氯酚農藥分析系統的還原偵測模式中，可被還原偵測物質的鑑定，採用了電化學循環伏安法及可見光/紫外光光譜來輔助證明。圖 (11) 中之循環伏安圖是 2,4,6-三氯酚經硝酸銻胺氧化後實驗所得，電位掃描區間為 0.3 ~ -0.1 V，圖 (11, a) 及圖 (11, b) 中的 2,4,6-三氯酚反應濃度分別為 0.5 及 0.0 mM，而圖 (c) 是在空白緩衝溶液中操作之循環伏安圖。可由圖 (11, a) 中觀察到在 130 與 75 mV 處有一明顯的可逆氧化還原峰，此氧化產物的電化學特徵具有苯醌類化合物的氧化還原特性；另外研究也利用可見光/紫外光光譜來瞭解 2,4,6-三氯酚農藥經硝酸銻胺氧化後產物的性質，由圖 (12, a) 中可輕易看見 25  $\mu$ M 2,4,6-三氯酚農藥經 1 mM 硝酸銻胺氧化後的產物，在波長為  $\lambda=273$  nm 處有一明顯的吸收峰，與 Yao (*Anal. Sci.* 19 (2003) 829-833.) 等人的研究結果相近；由上述電化學及光譜實驗的結果推測，

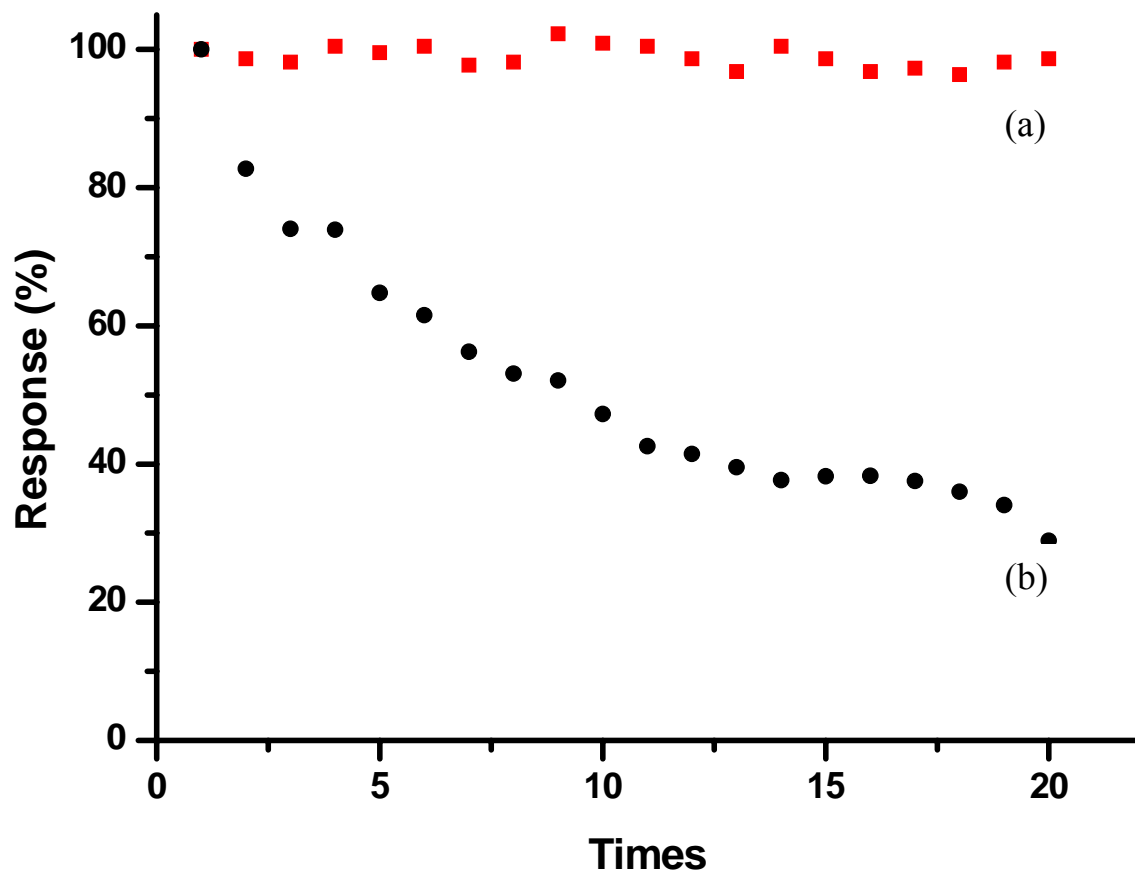


圖 (10) 偵測 2,4,6-三氯酚農藥的訊號再現性。圖中顯示經過硝酸銻胺氧化處理 (a) 及未處理 (b) 的 2,4,6-三氯酚，在連續 20 次操作下，測量 100  $\mu$ M 2,4,6-三氯酚農藥時，所獲得的訊號再現性圖，其它操作條件如圖 (9)。

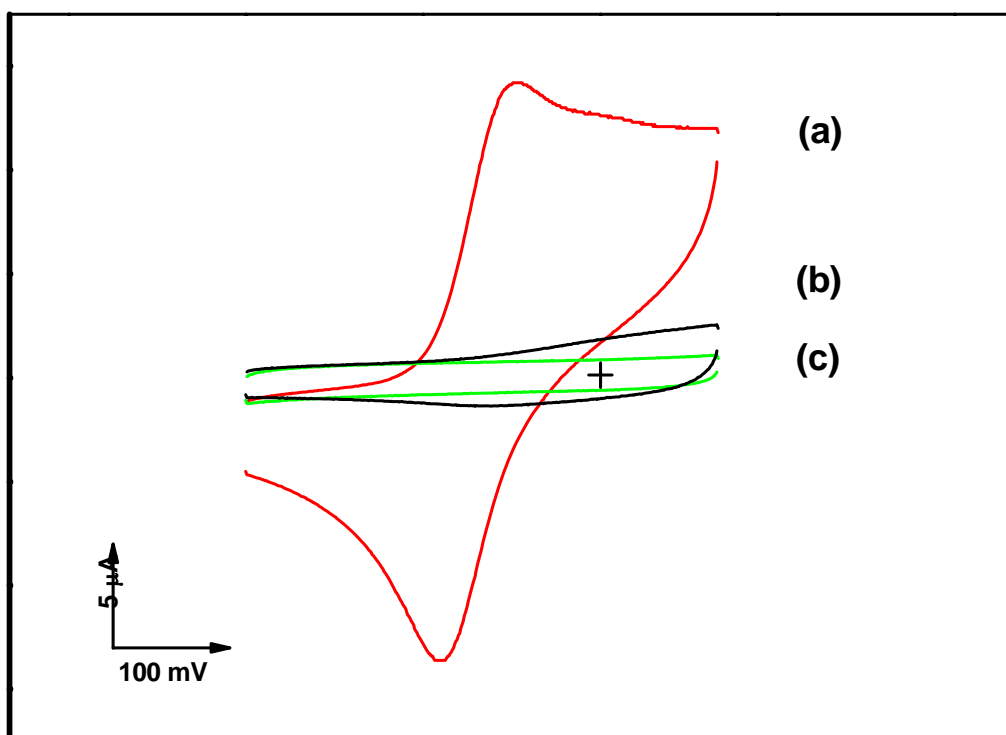


圖 (11) 2,4,6-三氯酚經硝酸鈾胺氧化後之循環伏安圖。圖中顯示 2,4,6-三氯酚經硝酸鈾胺氧化後所得的循環伏安圖，其三氯酚的濃度為 0.5 mM (a) 及 0.0 mM (b) ，而圖 (c) 是在空白緩衝溶液中操作之循環伏安圖。其餘操作條件如圖 (9) 所示。

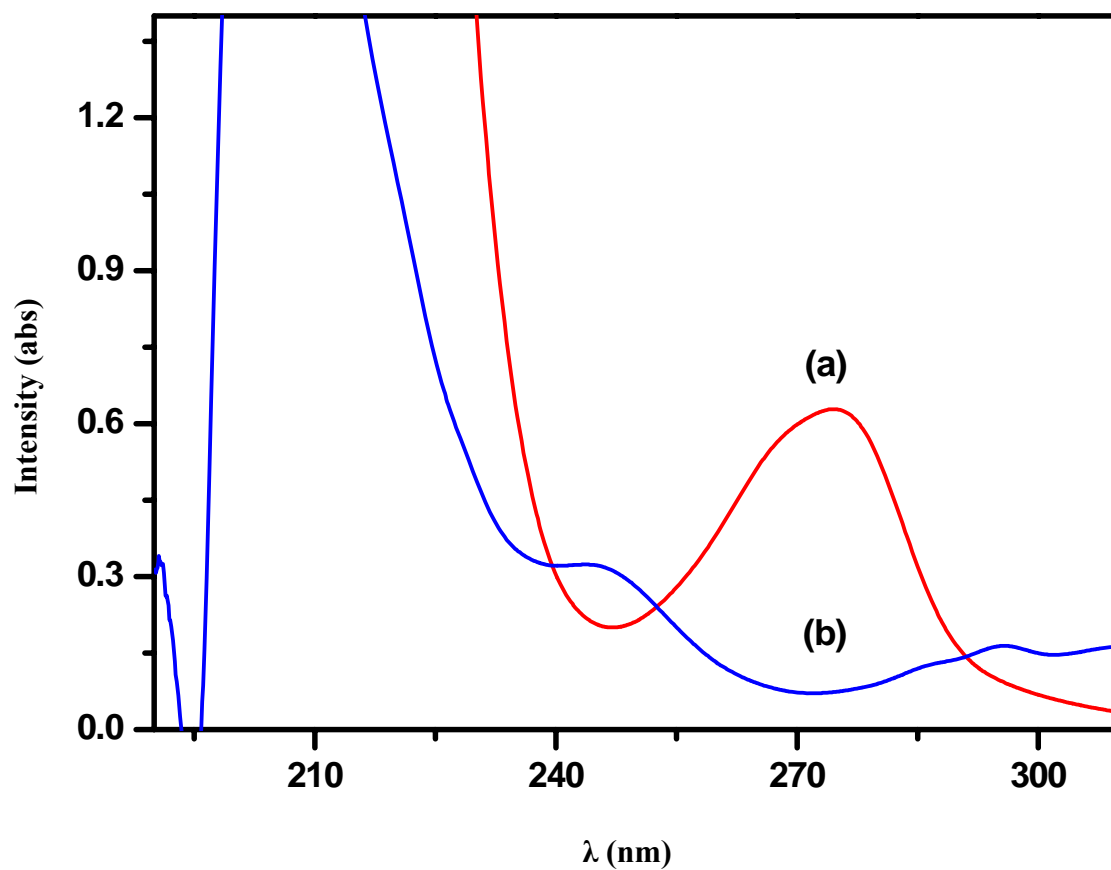


圖 (12) 2,4,6-三氯酚經硝酸鈾胺氧化後之紫外光光譜圖。圖中顯示 2,4,6-三氯酚經硝酸鈾胺氧化後所得的紫外光光譜圖，其三氯酚的濃度為 25  $\mu\text{M}$  (a) 及 0  $\mu\text{M}$  (b) ，其餘操作條件如圖 (9) 所示。

2,4,6-三氯酚農藥經硝酸銻胺氧化後的產物應是 2,6-二氯苯醌 (2,6-dichloro-1,4-benzoquinone)，因此可在玻璃碳工作電極上施加 -50 mV 之電壓進行還原偵測 2,6-二氯苯醌，而間接定量 2,4,6-三氯酚農藥，其反應機制可簡單表示如圖 (3-13)。

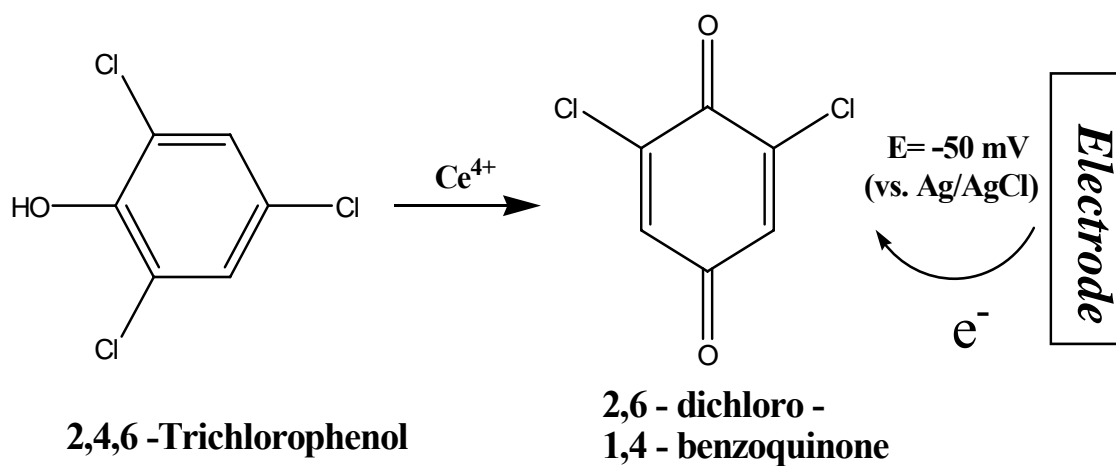


圖 (13) 2,4,6-三氯酚電化學偵測系統之還原偵測反應機制圖。

## 最佳化條件的探討

本研究在建立 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統，研究中使用硝酸銻胺氧化劑先與 2,4,6-三氯酚農藥反應，此前處理完畢的樣品溶液，再注射進入流注分析電化學系統進行還原偵測的分析。為使 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統有最佳的分析結果，研究探討了可能影響偵測特性之多項操作條件，包括：2,4,6-三氯酚農藥分析時的還原施加電位探討、溶液流速的探討、樣品迴路體積的探討、緩衝溶液酸鹼值及緩衝溶液種類的探討，此外也將對本研究系統的各项分析特性做詳細的評估，已獲取最佳的分析特性。

## 偵測電位的探討

研究初步的系統操作條件如下，2,4,6-三氯酚農藥在流動相為 0.05 M pH 3.0 之磷酸緩衝溶液，流注系統之流速為 1.0 mL/min、電極施加 -50 mV (vs. Ag/AgCl) 還原電位及樣品注射體積為 20  $\mu$ L 下，本實驗選擇對於 -100、-50、0、50、100、200 和 300 mV 等六個不同的操作電位加以探討，以獲得最佳之 2,4,6-三氯酚農藥偵測電位。結果如圖 (14) 所示，隨著還原電位的提高，可見還原電流會顯著上升，而超過 0 mV 之還原電位後，還原電流訊號呈緩慢增加，在 -100 mV 處偵測時已可見到明顯的訊號變率變大，可能原因是在較高的還原電位時會有顯著的氧氣干擾，因此研究最後選在相對訊號靈敏度佳，且分析系統環境干擾小的 -50 mV 為最佳之 2,4,6-三氯酚農藥偵測電位。

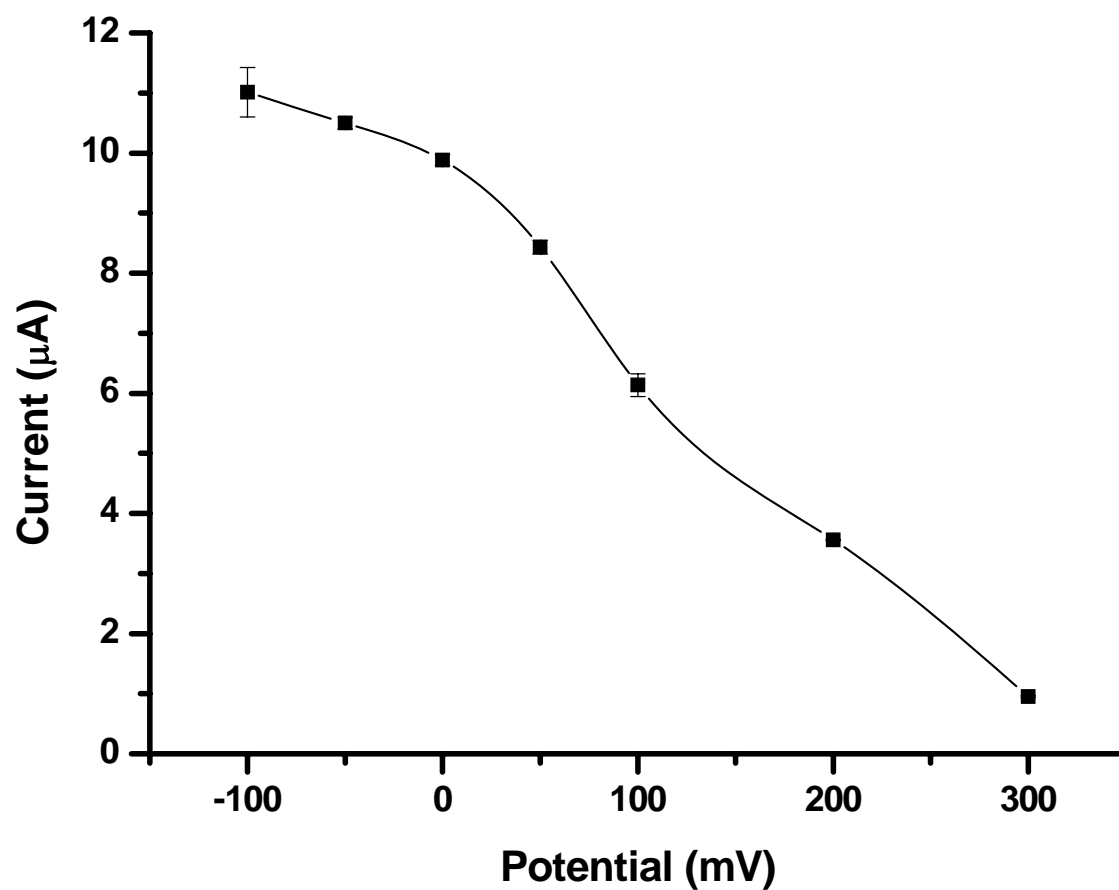


圖 (14) 2,4,6-三氯酚偵測系統的施加電位探討。利用電化學流注分析系統於施加電位在  $-100 \sim 300 \text{ mV}$  區間下，偵測  $20 \mu\text{L}$  之  $500 \mu\text{M}$  三氯酚所得的還原電流訊號，其中載流液體為  $0.05 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 3$  磷酸緩衝溶液，而流速為  $1.0 \text{ mL/min}$ 。



## 載流液體流速之探討

載流液體的流速會影響分析物在管路中的擴散程度及反應物與電極表面間的氧化還原反應的電子傳遞效果；當載體流速過慢時，分析物會在傳輸管路中擴散，使訊號的半波寬變寬及訊號峰降低的現象，會造成樣品分析時間變長及分析靈敏度變差的不良後果。而流速太快卻會使載流液體流失體積增加，讓溶液中的反應試劑消耗過大，當流速過大也可能會使電極表面產生之氧化還原物種，因反應尚不完全即被載流液體帶走而使訊號變小。研究探討了 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 和 1.2 mL/min 等共六種流體流速，評估流體流速對 2,4,6-三氯酚農藥分析系統的影響，實驗結果如圖 (15) 所示，由圖中可看出當流柱分析系統之流速低於 0.8 mL/min 時，所得還原電流值會快速的下降，可能是因為流速緩慢造成樣品在管路中被緩衝溶液稀釋的機率增加，所以還原電流變小，且每次分析所需的時間變長，並使半峰寬有變寬的趨勢；而流體速度高於 0.8 mL/min 後，所得的 2,4,6-三氯酚農藥還原電流訊號已趨平緩，因此實驗最後選擇流體流速 1.0 mL/min ，為本研究最佳之操作條件。

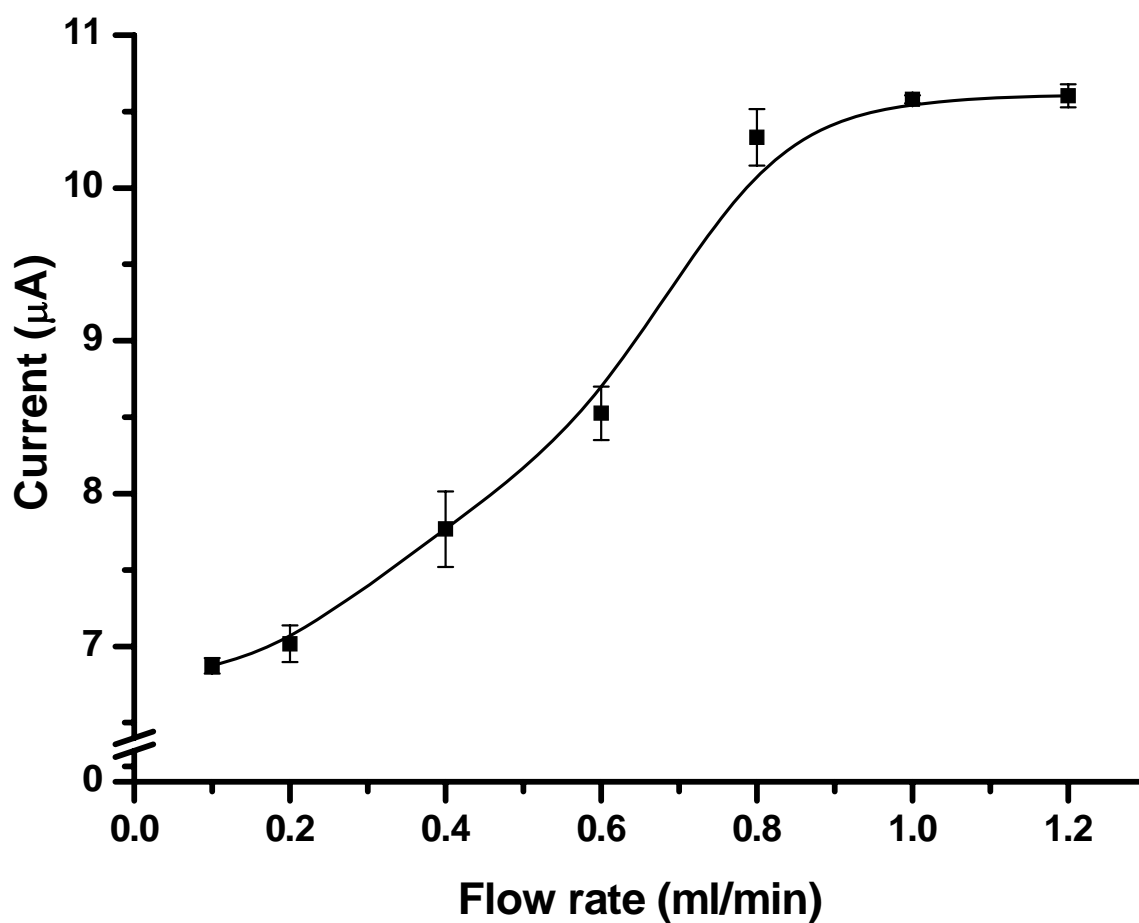


圖 (15) 2,4,6-三氯酚農藥分析系統之載流液體流速的探討。控制載體流速在 0.1 ~ 1.2 mL/min 間，評估其對偵測 2,4,6-三氯酚農藥之還原電流訊號的影響，此時的偵測電位為 -50 mV，而其它操作條件如圖 (14) 所列。

### 樣品注入體積的探討

注入樣品體積大小也會直接影響偵測訊號大小，甚至影響穩定度，其原因是樣品注入體積較小時，由於樣品注入後分析系統，須經載流液體帶至電化學偵測器，在管路中運送時，樣品濃度會被載流液體給稀釋，因此造成偵測還原訊號的降低，而注入之樣品體積過大時則會造成不必要的樣品浪費，這是微量分析系統相當不願看到的問題。實驗探討了樣品的注入體積，分別注入 10、20、50、100 及 500  $\mu\text{L}$  之樣品體積，所得樣品體積與還原電流訊號的關係如圖 (16, a) 所示，隨著注入體積的增加，所測得的還原電流訊號也越大，但當樣品體積大於 100  $\mu\text{L}$ ，甚至高達 500  $\mu\text{L}$  時，其還原電流值已幾乎趨於恆定，表示此時樣品在管路中的擴散問題已不存在，但上述研究結果若以單位時間之相對還原訊號來比較，進而選擇出的樣品操作體積會更好，因為此時的訊號峰寬較適宜，且同時具有不錯的訊號響應，如圖 (16, b) 顯示，在 20  $\mu\text{L}$  之樣品體積時，所得的訊號解析度最好，因此最後選擇 20  $\mu\text{L}$  的樣品注入體積為最適化條件。

### 溶液酸鹼度的探討

由 2,4,6-三氯酚農藥之偵測反應機制得知，本實驗所偵測的還原電流來自苯醌類氧化後產物，所以預期在較酸性的緩衝溶液中，應可獲得較高的還原電流訊號。研究選擇了酸鹼值為 pH 3、5、7 及 9 的 0.05 M 磷酸緩衝溶液，作為 2,4,6-三氯酚農藥分析系統的操作溶液，所得結果如圖 (17) 顯示，研究最後選擇訊號靈敏度較佳之較酸性磷酸緩衝溶液 pH 7.0 為最佳條件，並以此酸鹼度之緩衝溶液做後續的實驗條件探討。

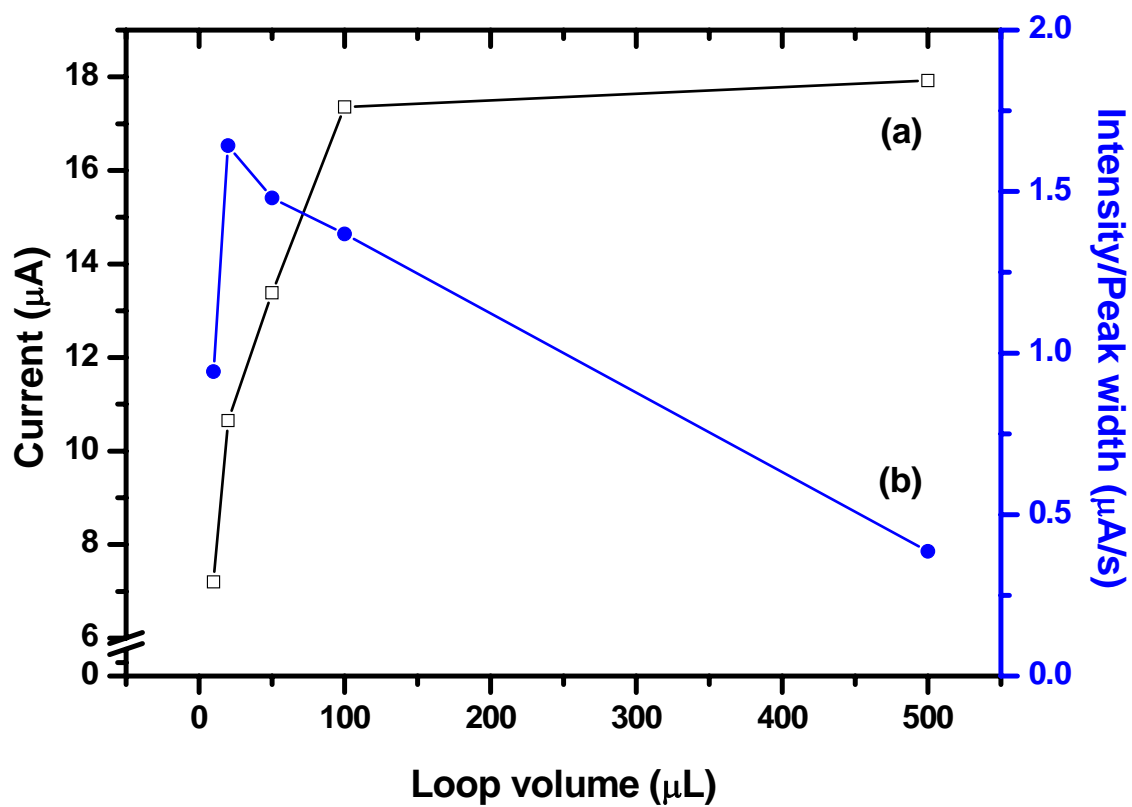


圖 (16) 注射樣品體積的探討。分別注入 10、20、50、100 及 500  $\mu\text{L}$  體積之樣品，並偵測 2,4,6-三氯酚農藥之還原電流訊號，系統之流體流速控制在 1.0 mL/min，其它操作條件如圖 (15) 所示。

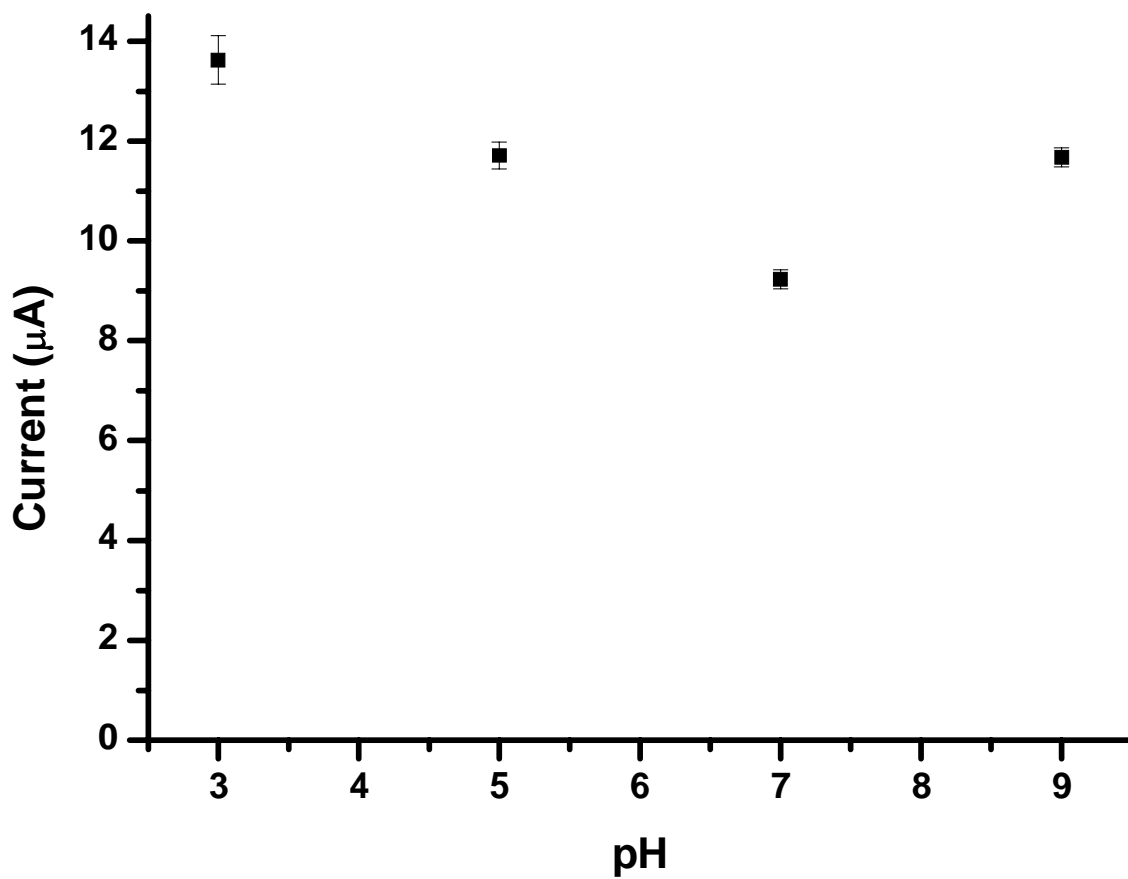


圖 (17) 緩衝溶液之酸鹼值的探討。在緩衝溶液之酸鹼值分別為 pH 3 、 5 、 7 和 9 下，評估其對偵測 2,4,6-三氯酚農藥之還原電流訊號響應的關係；樣品體積為 20 L，而其它操作條件如圖 (16)。

至此已探討完 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統的各項操作參數，包括：還原操作電位的探討、載流液體流速、注射之樣品體積、緩衝溶液酸鹼度、緩衝溶液電解質種類和緩衝溶液濃度等等，其最佳化結果整理如表 (3) 所示，並在系統之最佳化條件下，研究本偵測裝置的各項分析特性，如 2,4,6-三氯酚農藥化學偵測系統之濃度校正曲線、偵測極限之濃度和系統之操作分析再現性等等，將於下節中繼續做進一步的探究。

表 (3) 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統之最佳化條件

最適化參數	最佳化結果
施加電位	-50 mV
載流液體流速	1.0 mL/min
注射之樣品體積	20 $\mu$ L
溶液酸鹼值	pH 3.0
緩衝溶液種類	磷酸
緩衝溶液濃度	0.05 M

## 分析特性的探討

本研究已針對可能影響 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統的操作參數，做了詳盡的探討，並決定了本系統偵測 2,4,6-三氯酚農藥時之最佳操作狀態，在最適化條件：還原施加電位  $-50\text{ mV}$ 、 $0.05\text{ M}$  磷酸 pH 3 之緩衝溶液、流速為  $1.0\text{ mL/min}$  與注射樣品體積為  $20\text{ }\mu\text{L}$  下，探討本系統的分析特性，預得知的結果包含分析工作曲線、系統偵測靈敏度、分析再現性、偵測極限、干擾物以及真實樣品的評估等。

2,4,6-三氯酚農藥電化學偵測系統，在還原電位為  $-50\text{ mV}$ 、 $0.05\text{ M}$  磷酸 pH 3 之緩衝溶液、流速  $1\text{ mL/min}$  與樣品體積為  $20\text{ }\mu\text{L}$  的最適化操作條件下，所獲得的 2,4,6-三氯酚農藥濃度分析之工作曲線如圖 (18)，偵測濃度範圍是  $0.4\sim 750\text{ }\mu\text{M}$ ，每個濃度各重複偵測三次，結果顯示 2,4,6-三氯酚農藥線性濃度達  $750\text{ }\mu\text{M}$ ，且相關係數高達  $0.9999$ ，並求得此偵測系統的靈敏度為  $304\text{ mA/M}\cdot\text{cm}^2$ ；進一步的實驗得知在連續 20 次測量  $100\text{ }\mu\text{M}$  2,4,6-三氯酚農藥時，可獲得很好的操作再線性，相對標準偏差為  $1.569\%$ ，而系統的最低偵測濃度可達  $40\text{ nM}$  ( $S/N = 3$ )，為很靈敏的 2,4,6-三氯酚農藥電化學偵測系統，相關的分析結果整理於表 (4) 中，可知 2,4,6-三氯酚農藥電化學偵測系統具有相當好的分析特性。

## 干擾物的測定

由於環境中有許多干擾的存在，為了評估 2,4,6-三氯酚農藥電化學偵測系統在環境是否可有效避免干擾，實驗針對 SDS、樟腦及腐質酸做干擾程度的研究，這些干擾物的選擇可分別代表環境中常存在的兩性界面活性劑、巨大分子物質及環境中的易氧化物質，上述物質常影響電化學系統在環境分析時的準確性。偵測裝置在所選擇之干擾物存在下，於操作電位為  $-50\text{ mV}$  (vs. Ag/AgCl)，以  $0.05\text{ M}$ , pH 3 磷酸緩衝溶液，在流速為  $1.0\text{ mL/min}$ ，樣品迴路體積是  $20\text{ }\mu\text{L}$  的最佳化條件下，偵測  $50\text{ ppm}$  樟腦、SDS 及腐質酸，所得結果分別與標準  $20\text{ ppm}$  之 2,4,6-三氯酚農藥的訊號做比較，其誤差比例相當小，分別為  $0.98\%$ 、 $-2.99\%$  和  $-9.79\%$ ，顯示此分析 2,4,6-三氯酚農藥電化學流注系統具有良好的樣品偵測選擇性。除上述代表性干擾物的實驗外，研究找了多個酚類物質做探討，包括 2,4-二氯酚、2-氯酚、酚、2,4-二甲基酚及 4-胺基酚，在上述物質濃度均為  $20\text{ }\mu\text{M}$  下，相對於  $10\text{ }\mu\text{M}$  時 2,4,6-三氯酚的還原訊號，其干擾程度分別為 22、14、13、12 及 105%，其中 2,4-二甲基酚的影響最大，可能的原因是此化合物易於氧化，且其氧化後產物也是苯醌類產物（結果未附）所造成，因此分析樣品若有此物質的存在，需考慮以層析分離的方式來解決。

## 回收率 (Recovery) 的探討

本實驗為了應用於水樣品的偵測，在操作電位為  $-50\text{ mV}$  (vs. Ag/AgCl)， $0.05\text{ M}$ , pH 3 之磷酸緩衝溶液，流速為  $1.0\text{ mL/min}$ ，樣品迴路體積是  $20\text{ }\mu\text{L}$  的

最佳化條件下，在二種來源不同的水樣品中分別加入 20 ppm 2,4,6-三氯酚農藥，並評估加入農藥之回收率，所測得的結果分別是田間水為 105.2% 及校園池塘水為 107.5% ，顯示本系統可適用於實際水樣的分析。

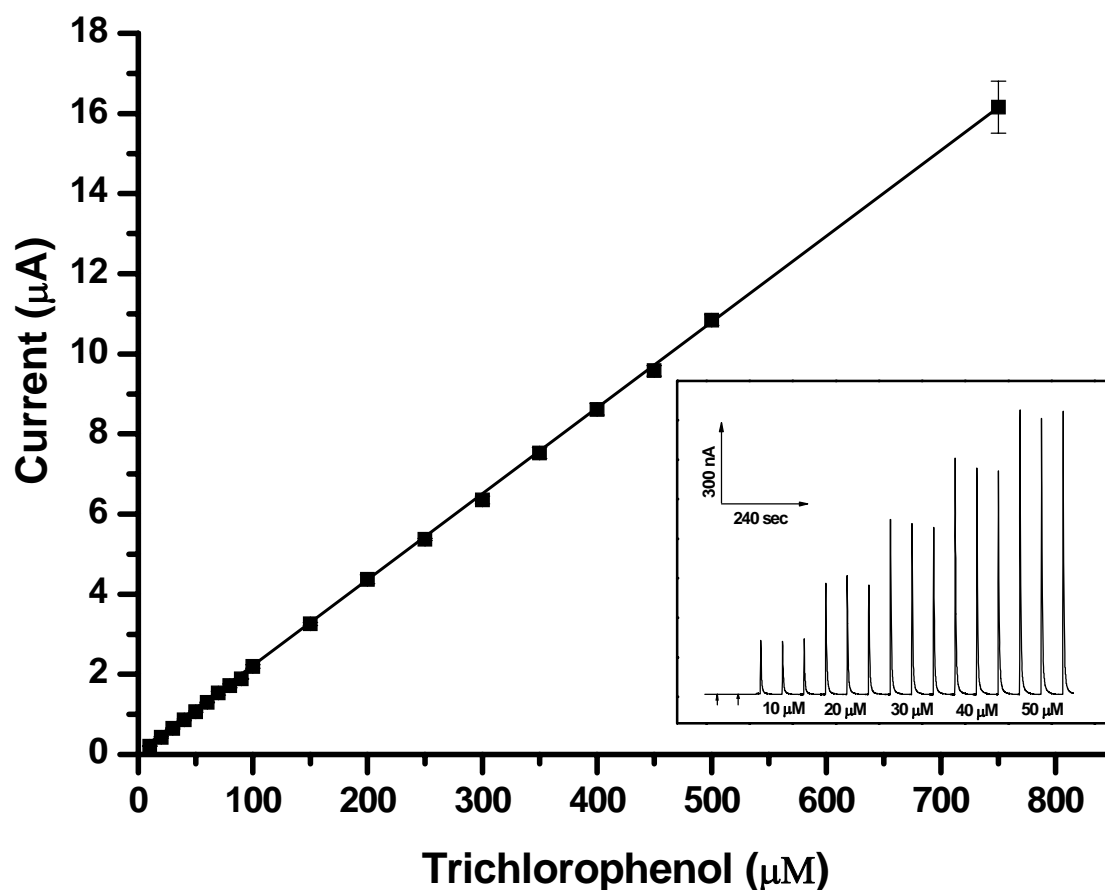


圖 (18) 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統之濃度校正曲線。2,4,6-三氯酚農藥偵測系統在最佳化操作條件下，連續測量濃度在 0.4 ~ 750  $\mu\text{M}$  間的 2,4,6-三氯酚農藥，所得的還原電流訊號響應，其緩衝溶液之酸鹼值為 pH 3 ，而其它最適化的操作條件如圖 (17) 。



表 (4) 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統之分析特性

分析特性	結果
濃度線性範圍	0.4 ~ 750 $\mu\text{M}$ ( $R=0.9999$ )
分析靈敏度	304 $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$
操作再現性	1.56% (N=20)
偵測極限濃度	40 nM (S/N=3)
干擾物(樟腦)	0.98%
干擾物(SDS)	-2.99%
干擾物(腐質酸)	-9.79%
回收率(田間水)	105.2%
回收率(池塘水)	107.5%

## 結論

本實驗已成功發展出 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統，由上述的研究成果得知，本系統在最佳化操作條件下：即與 2,4,6-三氯酚農藥分析物反應之氧化劑硝酸銨銻的濃度為 5 mM、偵測電壓為 -50 mV (vs. Ag/AgCl)、0.05 M, pH 3 之磷酸緩衝溶液、流速為 1.0 mL/min 及樣品體積 20  $\mu$ L 下偵測 2,4,6-三氯酚農藥，分析結果顯示了多項優點，如 2,4,6-三氯酚之偵測濃度線性範圍長，在 10 ~ 750  $\mu$ M 間且其線性相關係數更高達 0.9999 (n=19)，具有很好的操作再現性，相對標準偏差為 4.03% (n=20)，而偵測極限濃度可低至 40 nM (S/N=3)，並具有高的分析靈敏度 (304 mA/M $\cdot$ cm<sup>2</sup>)。偵測電位為 -50 mV 下，評估環境水樣中常見的干擾物影響分別為：腐質酸 (-9.79%)、SDS (-2.99%) 及 Camphor (0.98%)，顯示整體的干擾程度不大，此外分析實際農田及校園池塘水樣時，皆獲得不錯的回收率，分別為 105.2% 及 107.5%，由上述可知本系統可直接應用於環境水樣的分析，有效改善了過去檢測上使用層析或質譜分析法上的操作繁複及儀器昂貴等問題，也解決過去使用酵素發展 2,4,6-三氯酚農藥偵測時，須消耗大量酵素及系統複雜的問題，可知本研究開發之 2,4,6-三氯酚農藥偵測系統有其進一步的利用價值。

### 第三部分 連續式脈衝電極再生系統於乙烯硫脲偵測

#### 簡介

自動化分析，IUPAC 對其定義為「利用機械及儀器裝置之組合以取代、改善或輔助人類的操作，或甚至涉及改變原來的設計，但是組合中至少要有一個主要的動作是能反饋的」。近年來自動化的分析儀在分析領域上有其重要性，在生化、醫學、工業或學術界的領域都可窺見。事實上，早期工業界就已經有將儀器自動化和製程結合之構想，但是有礙於造價昂貴，機器的保養、維修，人員的訓練等，所以並不如想像中普遍。如今進入積體電路的時代，電腦效能的提升及價格優勢已經不可同日而語，成為現今不可獲缺的工具，而自動化帶來的時間和人力的經濟效益是非常可觀的，就以觀察細菌生長曲線的實驗來說，人力方式觀察，需要長時間的等待，固定一段時間就要取樣、分析，若以自動控制分析儀器取代，人力和時間可以更彈性運用。更有尤者，一些不適合實驗人員實驗的場所，例如：長時間偵測核電廠排放出來廢水所含的輻射劑量，就更需要一套完整的自動控制分析系統來進行分析、監測的工作，因此分析儀器的自動化幾乎已經是一種重要的趨勢。

本研究利用 LabVIEW 應用程式，整合開發一套精準、快速而且便利實用的流注分析系統；此應用程式 LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) 是由美商慧基儀器股份公司(National Instruments) 於 1986 年所發展的應用軟體，為一套專為資料擷取、儀器控制與資料分析而設計的革命性圖控程式語言，它提供了一個嶄新的程式設計方法，只需將所謂的虛擬儀表 (Virtual Instrument) 物件以流程圖的方式加以連接組合，便可完成所需要的系統；加上此程式對使用者來說，很容易就可上手。故 LabVIEW 能被如此廣泛應用，是因為它具有多項功能及特性：(1) 訊號擷取 (signal acquisition)：LabVIEW 可以擷取各類微小精密訊號，包括人體的生物醫學訊號。(2) 儀器串聯控制 (serial instrument control)：利用 LabVIEW 所架構出虛擬的介面，可用來控制實驗室中的各種儀器，進而將龐大或繁雜的系統整合簡化成可簡易操控之儀器。(3) 資料呈現 (data presentation)：LabVIEW 能將大量的數據彙整後，以各式簡單的圖表呈現出來，以提供使用者做更精確且快速的分析。(4) 資料分析(data analysis)：LabVIEW 提供了各類數學運算或統計分析的功能，可將收集的資料，以更有效益的結果呈現出來。(5) 資料儲存 (data storage)：LabVIEW 也能夠將所得的數據結果，儲存至各種形式的檔案格式，以方便將資料做進一步的處理或備份儲存。

LabVIEW 起初被廣泛地使用於實驗室，從世界主要研究與發展的實驗室，如美國 Lawrence Livermore 和 Jet Propulsion 實驗室，以及許多工廠的 R&D 實驗室，但是到了今天，LabVIEW 的使用範圍已經跨越了實驗室，如太空梭和美國海軍潛艇上的使用，已遍及世界各地，根據報導顯示 LabVIEW 在國外工業界作為 PC-based 資料擷取及儀器控制軟體開發工具普及率達 42.9%<sup>(123)</sup>。

本研究中發展的自動控制流注分析系統，即是使用 LabVIEW 當作是儀器控制以及訊號擷取的軟體介面，利用 LabVIEW 的優點，可精準控制電化學分析所需要的氧化操作電位和活化電極表面需要的脈衝條件，再藉著 LabVIEW 準確擷取偵測樣品時產生的電流訊號，配合流注分析系統，建構出一套自動化之電化學

流注分析系統。本研究以發展一套偵測乙烯硫脲 (ethylene thiourea, ETU) 農藥自動化分析系統為目標，使用一般個人電腦結合 LabVIEW、流注分析系統以及電化學偵測器來完成對乙烯硫脲的監控，不但達到偵測的目的且確切解決電化學方法直接偵測乙烯硫脲時所發生電極毒化的問題，並改善傳統電極脈衝活化處理時的繁複步驟，並避免人力的浪費及提高分析的重複操作再現性，使對於乙烯硫脲偵測監控達到更有效率、更準確。

### 乙烯硫脲分析的重要性

乙烯硫脲為乙烯基二硫代胺基甲酸鹽 (ethylenedisithiocarbamate, EBDC) 這類農藥的主要代謝產物，如圖 (19) 所示。EBDC類農藥如：鋅乃浦 (zineb)、錳乃浦 (maneb) 和鈉乃浦 (nabam) 等等在農業上常作為殺菌劑，主要使用於蕃茄、馬鈴薯和大豆等農作物，毒性  $LD_{50}$  在 300 至 5000 mg/kg，雖然毒性不高，但是 EBDC 容易被分解成具有致癌性的產物乙烯硫脲，同時被國際癌症研究組織歸類為 Group 2B<sup>(124)</sup>，因此偵測蔬果中乙烯硫脲殘餘的劑量是有其必要性的。乙烯硫脲主要是由 EBDC 代謝而產生，其途徑可參考圖 (19)，室溫下乙烯硫脲對水的溶解度為 20,000 ppm，在 pH 5~9 範圍中可以穩定存在水溶液中 90 天以上<sup>(125)</sup>，但是乙烯硫脲會經由光分解、化學氧化及動、植物<sup>(126)</sup> 的代謝產生各種胺類，最終代謝成二氧化碳。乙烯硫脲對白鼠之口服急毒性  $LD_{50}$  為 1832 mg/kg，且經由動物實驗證實有致癌性，一般來說每天經由攝食進入人體的乙烯硫脲劑量最高不能超過 3.65 g/kg。

由於現代蔬果種植都使用大量農藥來驅蟲殺菌，在食用蔬果和環境的殘留是無法避免的，因此如何從已採收的蔬果中檢測出乙烯硫脲殘餘量已經成為我們主要的課題，

由於 FIA 流注分析系統分析速度快，並且可以長時間連續偵測分析物等優點，本實驗欲將 LabVIEW 自動控制系統結合 FIA 流注系統偵測農藥代謝生成的致癌物質，乙烯硫脲。

### 乙烯硫脲的偵測方法

農藥的分析與檢驗上經常藉助層析分離技術 (Chromatographic Separation)，利用層析原理可使農藥的分析更具有選擇性及專一性。乙烯硫脲的偵測使用 gas-liquid chromatography (GLC) 或 high-pressure liquid chromatography (HPLC) 等將乙烯硫脲分離出來，再配合各種不同偵測系統作偵測。1977 年，King<sup>(127)</sup> 使用 GLC 分離方法和 flame-photometric method 偵測乙烯硫脲，分離管柱長 1.8 m、半徑 3.5 mm，管柱、注射器及偵測器溫度設定為 195°C、225°C、185°C，氣體流速為：氮氣 60 mL/min、氫氣 120 mL/min、空氣 40 mL/min、氧氣 20 mL/min。在此條件下，偵測乙烯硫脲線性範圍達到 0.25 ppm。

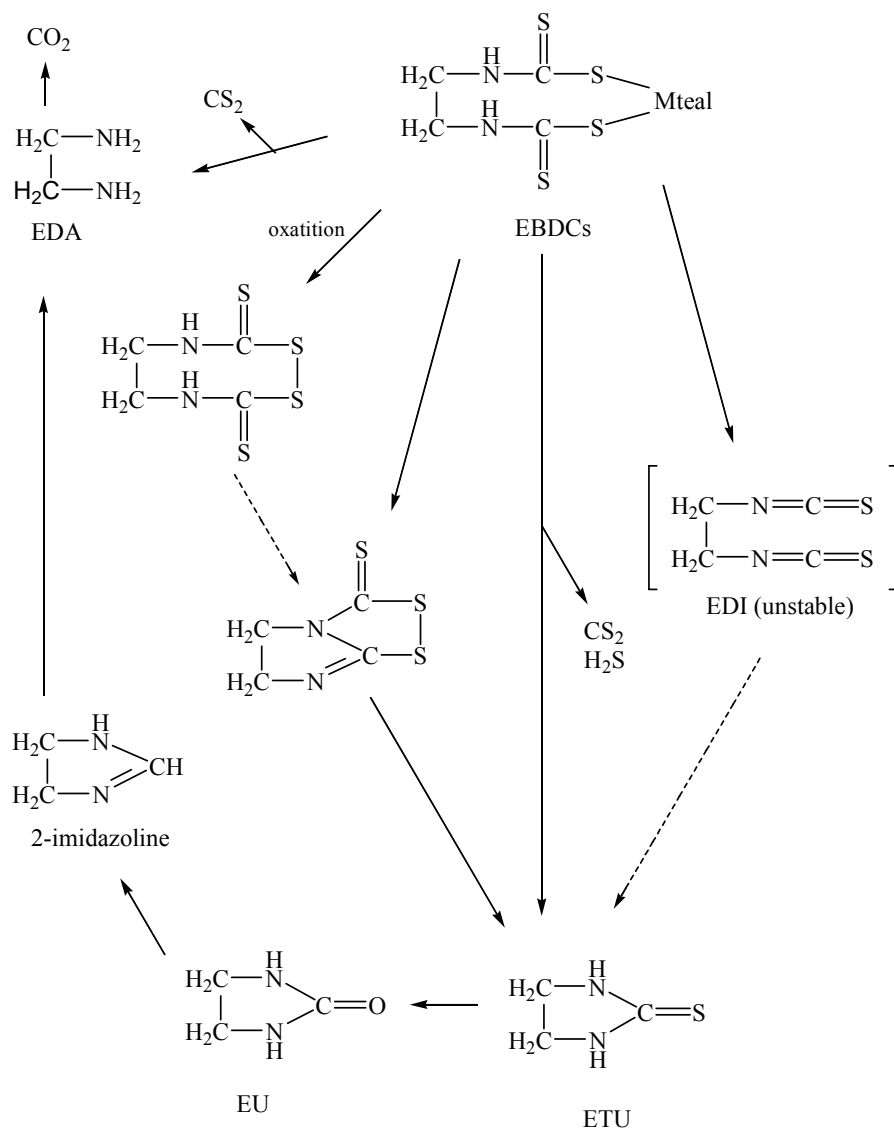


圖 (19) 乙基二硫代氨基甲酸鹽代謝產生乙烯硫脲的途徑。

## 實驗部分

### 儀器

本研究在發展一套脈衝式電極再生系統，以清除乙烯硫脲氧化偵測後產生的電極毒化現象，且有別於過去發展的間斷式脈衝電極再生技術，而是開發成連續式的電極再生偵測系統，基於這樣的目的，本系統須具備的裝置包括：連續式電極再生之脈衝電壓產生系統、樣品自動注射之流注電化學分析系統和訊號擷取及資料處理系統。

本實驗利用自己設計的自動控制監控系統配合電化學偵測器來偵測乙烯硫脲之氧化電流。使用自組裝之定電位儀 (home-made)，以提供偵測乙烯硫脲時的氧化電位及再生電極所需的脈衝電壓，而系統自動化是以 LabVIEW 圖控程式 (Labview 5.0, National Instrument, USA) 來撰寫自動化分析系統所須具備的功能，因此程式包含了氧化乙烯硫脲之電位及時間的控制、氧化電流訊號的擷取、活化電極表面之脈衝電壓的強度、頻率和振幅控制以及即時監控螢幕顯示和數據處理等功能，完成的 LabVIEW 程式以電腦螢幕顯示，其操作介面之工作平台如圖 (20)。

此外，流注系統部分，其流體的運送是使用蠕動泵浦 (302S, WATSON, England) 來推動，乙烯硫脲樣品是使用自動注射閥 (ETMA-CE, VICI, USA) 配合使用 20 L 的不鏽鋼樣品迴路將定體積的樣品注入分析系統。自製定電位儀所構成的電化學反應系統，內含的三電極系統 (Bioanalytical system, Inc., Indiana, USA) 分別以玻璃碳電極為工作電極、Ag/AgCl 電極 (3M KCl) 為參考電極，白金線材為輔助電極，最後乙烯硫脲的偵測及訊號擷取，則利用上述之自動化系統來完成。

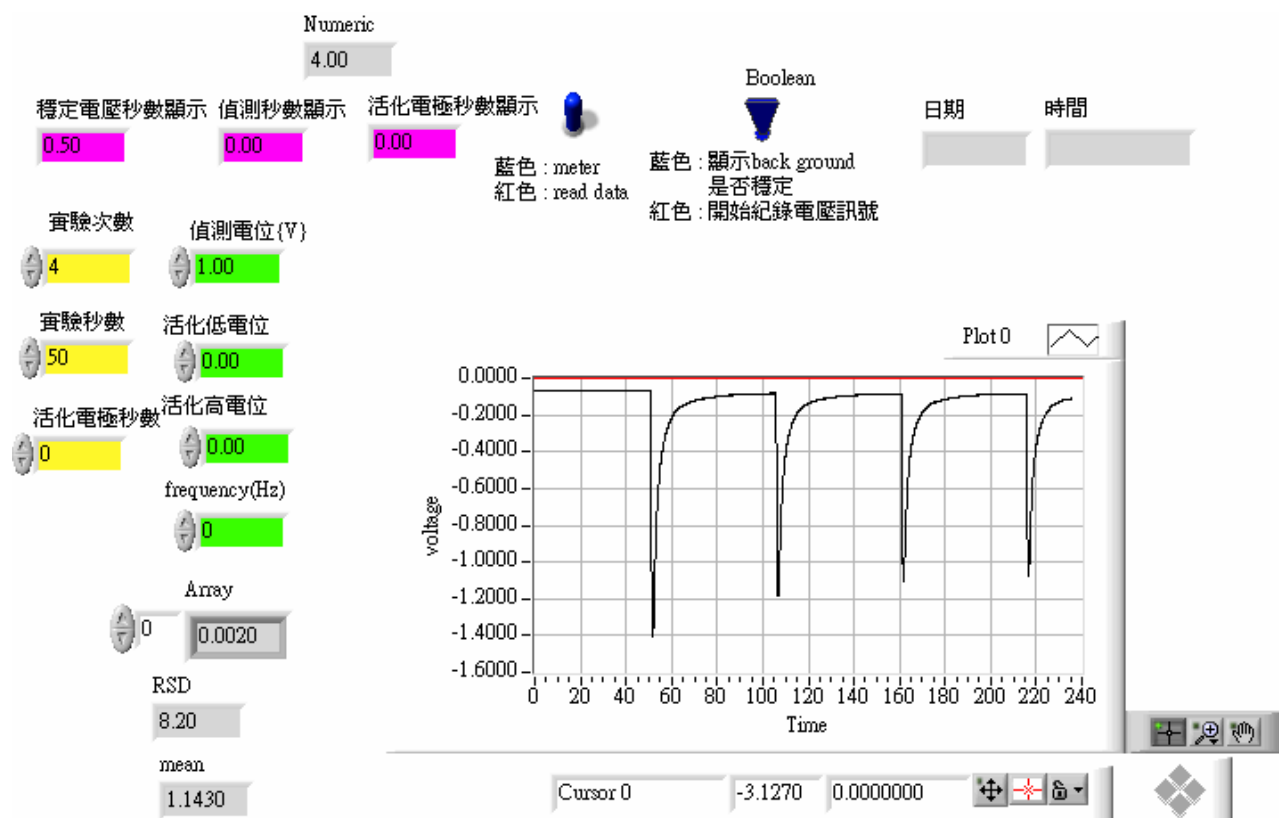


圖 (20) LabVIEW 工作平台

## 藥品

實驗中所有的藥品配置使用的超純水是經由逆滲透系統 (Barnstead/Thermolyne, Easypure RO, USA) 和透過含 0.2  $\mu\text{m}$  細菌過濾膜之試藥級水系統 (Barnstead/Thermolyne, Easypure UV/UF, USA) 所製造出的純水，所使用的樣品及藥品溶液皆新鮮配置或置於 4  $^{\circ}\text{C}$  進行保存。分析之樣品乙烯硫脲購自 Supelco (Pennsylvania, USA)，而實驗中使用的緩衝溶液如磷酸氫鈉 (di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate, phosphate) 和磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate) 以及鐵氰化鉀 (potassium hexacyanoferrate) 購自 Riedel-deHaen (RDH, Seelze, Germany)。電極拋光研磨使用之 0.05 及 0.1  $\mu\text{m}$  粒徑大小的氧化鋁粉 (aluminum oxide power) 購自 Baikalox 公司。

## 實驗部分

### 電極拋光處理

玻璃碳工作電極以 0.05 及 0.1  $\mu\text{m}$  粒徑的氧化鋁粉進行表面拋光後，置於蒸餾水中以超音波震盪清洗電極表面，並利用循環伏安法掃描鐵氰化鉀標準物，用來檢視電極表面是否清理乾淨，並且在每次進行實驗探討前，先偵測 1.0 mM 乙烯硫脲的氧化電流，其訊號為 5% 的誤差內，才開始後續之實驗，提供此最佳的電極表面狀態，以確保偵測系統之可靠性及再現性。

### 電極再生系統

實驗中需要使用脈衝技術來再生電極表面的活性，以提升偵測乙烯硫脲的準確及再現性，所需要的脈衝強度、時間以及頻率是使用 LabVIEW 軟體，經由控制電位儀而產生，由於脈衝的強度、時間以及頻率皆會影響到電極再生的效果，所以實驗初步會先針對此三個處理電極的條件最適化進行探討。實驗於流注分析系統下進行，在含有 0.05 M pH 7 的磷酸緩衝溶液、乙烯硫脲之氧化偵測電位為 + 1.0 V、載流液體流速為 0.5 mL/min、樣品體積為 20  $\mu\text{L}$  的操作條件下，每次注入 1mM 乙烯硫脲偵測氧化電流訊號，詳盡探討電極再生條件對系統的影響。

## 結果與討論

本研究目的旨在發展一套分析農藥代謝致癌物乙烯硫脲的自動化偵測分析系統。由於直接偵測乙烯硫脲的氧化時會有電極毒化的現象，因此需提供合適的電極活化再生方法，以提供系統的良好再現性，本系統是利用交流脈衝電壓使電極達到活化再生的目的，同時配合 LabVIEW 程式的整合來達成系統連續式操作及自動化的目的。為進一步瞭解本系統反應作用機制及各項操作條件對偵測工作的影響，將針對本系統工作原理、乙烯硫脲氧化偵測電位、電極表面活化使用之脈衝強度、脈衝頻率、脈衝時間、溶液 pH 值、注入乙烯硫脲體積、流速以及分析特性等等做一系列探討，將詳述於後。



## 工作原理的探討

本系統是利用電化學技術直接於玻璃碳工作電極施加一高的氧化電位，即可獲得乙烯硫脲的氧化電流訊號，此結果可由循環伏安法得知隨著掃描次數的增加，氧化電流會逐漸變小，如圖 (21) 所示，圖中 (A) 為不含乙烯硫脲樣品之對照組，而 (B) 及 (C) 則分別是 20 mM 乙烯硫脲以循環伏安法做一次及二十次掃描所得的氧化訊號圖，可明顯的觀察到乙烯硫脲經二十次氧化掃描後，氧化訊號電流值只剩原本的一半，推測可能的原因是乙烯硫脲氧化後的產物，會吸附在電極上，而使電極表面的電子傳導性質及活性降低，而導致工作電極收集到的氧化電流銳減。電化學方法直接偵測乙烯硫脲所造成的電極毒化現象，可利用各種活化電極表面的方式處理，包括直流電壓處理、雷射脈衝處理、電極拋光處理及化學再生方法等，但都有再生處理步驟繁雜且耗時的問題，而本研究是採用施加連續式脈衝電壓處理以活化再生電極的方式，直接在偵測過程中，線上 (on-line) 做電極表面的再生反應，玻璃碳電極毒化的表面經由合適的脈衝電壓處理，可達成將附著物質剝離而經流體帶走的目的，並且使電極面生成穩定的活化狀態，以利多次偵測乙烯硫脲樣品而不會造成電極毒化使氧化訊號的衰減；研究中將以 LabVIEW 程式來控制清除電極毒化的脈衝電壓，包括它的脈衝強度、時間及頻率等功能，以完成連續式、線上、快速且自動化偵測乙烯硫脲的最終目標。

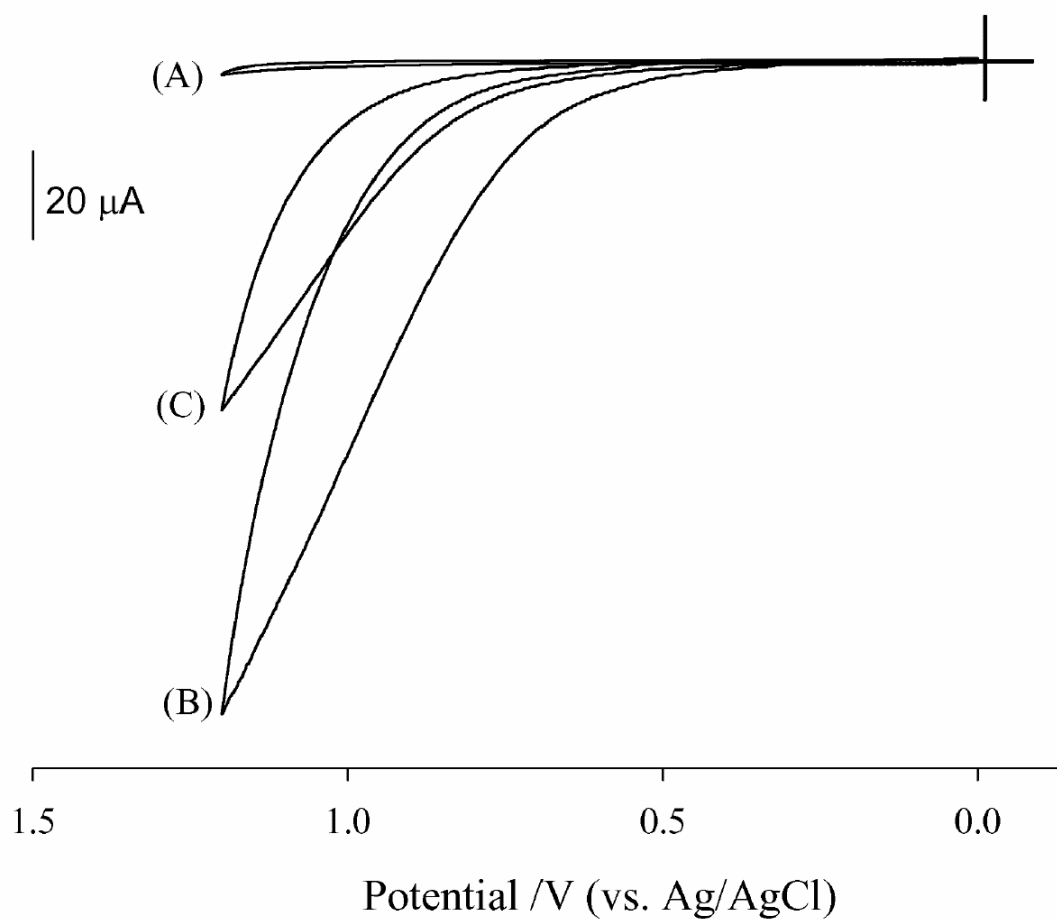


圖 (20) 乙烯硫脲的循環伏安圖。在 (A) 0 及(B) 20 mM 乙烯硫脲之 0.05 M, pH 7 磷酸緩衝溶液中，所得之循環伏安圖，而圖中 (C) 為連續 20 圈掃描後之訊號圖，其掃描速率為 0.1 V/sec。

## 最佳化條件的探討

自動化脈衝電壓再生電極系統，應用於乙烯硫脲的氧化偵測，所需探討的操作參數除了控制電極表面活化使用之脈衝強度、時間及頻率外，偵測系統中與電化學反應和自動注射流動系統相關的操作條件有乙烯硫脲氧化偵測的施加電位、載流液體的 pH 值、緩衝溶液的種類及濃度、載流液體的流速及注入乙烯硫脲樣品的體積等等，將詳細探討於後。

## 電極再生處理的研究

利用電化學循環伏安法探討乙烯硫脲的電化學性質，已知在電位掃描區間 0.0 ~ 1.0 V 可發現氧化施加電位在 0.6 V 以上開始有氧化電流訊號產生，因此初步先以訊號靈敏度不錯的施加電壓 1.0 V，當作乙烯硫脲的氧化偵測電位，而其餘操作條件則為 0.05 M pH 7 的磷酸緩衝溶液、樣品注射體積為 20  $\mu$ L、載流液體流速 0.5 mL/min 下連續偵測 6 次 1.0 mM 乙烯硫脲，觀察其氧化電流訊號的變化，所得的氧化訊號會因電極毒化逐次下降，但是隨著流體沖提電極表面的時間拉長訊號會慢慢增加，在載流流體沖提 4 分鐘後，訊號可約略與第一次偵測乙烯硫脲氧化時一樣，推測乙烯硫脲只是單純的物理吸附在電極表面而造成電極毒化，因此為了降低偵測每個樣品所消耗的時間，及提高分析準確性，本研究利用簡單的電壓脈衝技術來去除電極毒化的現象，而由於電極再生之脈衝電壓與所施加的脈衝強度、時間和頻率有密切關係，為了使電極再生有最好的效果，將針對上述參數做仔細的探討。

## 脈衝強度探討

脈衝強度於電極再生處理中為首要因素，不同的電極材料及不同的分析樣品，產生的毒化現象與特性將有所不同，隨物質吸附上電極表面的強弱不同，須選擇適合的脈衝電壓來處理，使電極表面再生並獲得較好的分析結果。實驗先由脈衝電壓的施加強度開始探討，在前述實驗條件下，固定脈衝頻率為 10 Hz，脈衝時間為 20 秒，每次偵測乙烯硫脲後分別對電極表面施加不同的脈衝強度，連續偵測 6 次得到乙烯硫脲氧化電流訊號，觀察其氧化訊號的再現性，以決定實驗最適當的脈衝強度，脈衝電壓與時間關係的示意圖如 (22) 所示，圖中  $E_{\text{detection}}$ 、 $E_{\text{equilibrium}}$  和  $E_{\text{cleaning}}$  分別是乙烯硫脲之氧化偵測電位、氧化偵測電位的穩定和電極毒化清除反應的時間，研究也嘗試利用正負電壓脈衝方式來處理電極毒化問題(結果未附)，但效果不佳，應是正負脈衝操作下，會造成欲去除之毒化物質再度吸附於電極上，而使去毒化的效益大幅降低。而圖 (23) 中，橫軸座標 0、1、2、3、4 及 5，分別表示施加的交流脈衝強度為 no pulse、0~1.2 V、0~1.3 V、0~1.4 V、0~1.45 V 及 0~1.5 V，可以明顯觀察到使用脈衝強度在 1.3 V 以下，脈衝清除的效果不佳，以相對標準偏差 (RSD) 代表其分析時的變率，得到的 RSD 高達 7%，可知此脈衝強度無法有效清除電極表面之吸附物質，而脈衝強度提高至 0~1.4 V 時，其代表分析變率之 RSD 降至 1.19%，已可有效使電極再生並保持良好的再現性。而電極處理之脈衝強度高過 1.4 V 後，偵測訊號的再現性變差，主要的原因是電極上施加的電壓過大，使玻璃碳電極表面遭受輕度的破壞，導致每次偵測 乙烯硫脲的訊號，隨著電極表面的變化而改變，而使所得分析結果不佳，最後為了保持電極的穩定性及偵測 乙烯硫脲結果的再現性，實驗選擇脈衝強度 0~1.4 V 作為再生電極表面的最佳操作條件。

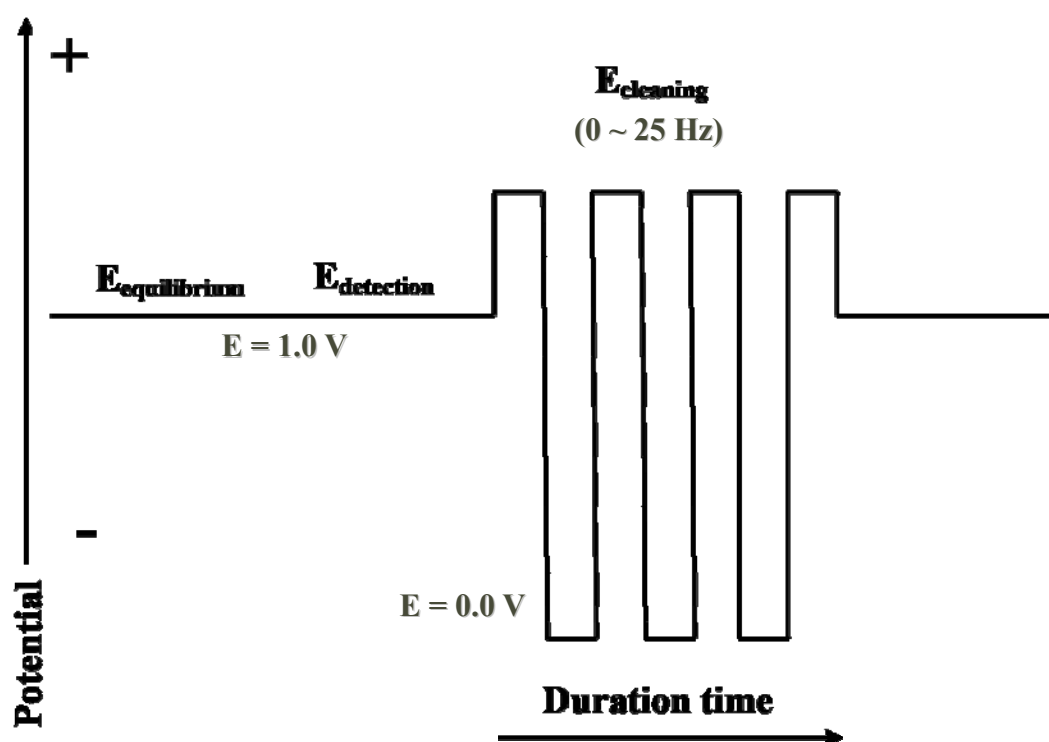


圖 (22) 偵測電位及電極再生脈衝電壓與時間的關係圖。

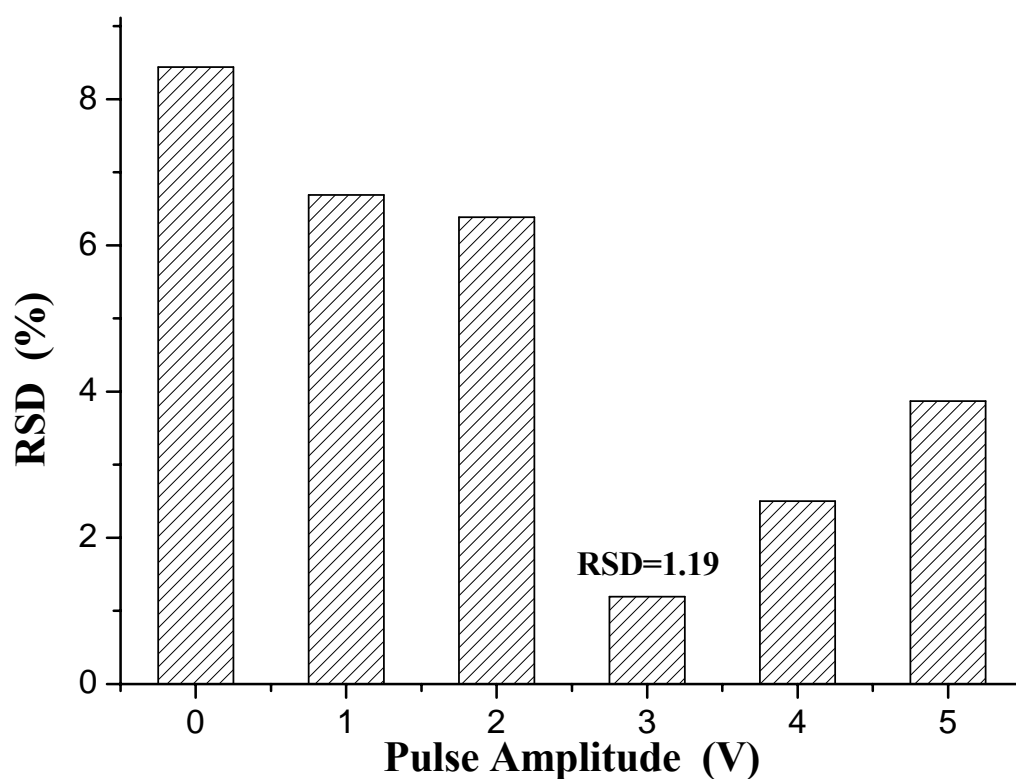


圖 (23) 脈衝強度的探討。於 +1.0 V 下偵測 1.0 mM ETU 後，針對脈衝強度為 (0) no pulse 、(1) 0~1.2 、(2) 0~1.3 、(3) 0~1.4 、(4) 0V~1.45 及 (5) 0 V~1.5 V 對毒化現象做處理，並偵測 ETU 6 次之相對標準偏差。操作條件為：0.05 M, pH 7 之磷酸緩衝溶液、流速 0.5 mL/min 、注入樣品體積為 20  $\mu$ L 、脈衝頻率 10 Hz 及處理時間為 20 秒。

## 脈衝頻率探討

決定主要影響電極毒化清除效率的脈衝電壓強度後，將針對脈衝頻率做研究，而脈衝頻率的快慢，預期也會影響電極再生的效果，因為當頻率過慢時，相對的玻璃碳電極可能遭遇持續偏高電壓 1.4 V 的施加愈久，而電極表面受到破壞的機會變高，自然工作電極的穩定性就會變差，這些推論可由脈衝強度的最佳化實驗探討中得知。實驗中研究的脈衝頻率有 0、5、10、15、20 及 25 Hz 共六種，而所得結果如圖 (24) 所示，比較使用不同脈衝頻率再生電極表面，偵測 1.0 mM 乙烯硫脲共 6 次所得到的相對標準偏差值可以發現，電極表面再生的效果，隨著脈衝頻率的增加而變好，即相對標準偏差值較小，但在脈衝電壓頻率較低時，分析變率明顯上升，與推測之結果相吻合，最後由探討的脈衝頻率結果比較得知，電極再生之脈衝頻率施加，以 15 Hz 所得效果最為適當，相對標準偏差只有 0.65%，相當適合當最佳之操作條件以供後續的研究探討。

## 脈衝時間探討

電極再生的脈衝電壓探討，除了上述兩項因素，脈衝強度與脈衝頻率的影響外，脈衝電壓處理以清除毒化之施加的時間也是影響電極表面再生的條件之一，因為若脈衝電壓施加時間不足，將無法有效清除吸附在玻璃碳電極表面的物質，而造成吸附物質緩慢增加在電極表面上，同時偵測乙烯硫脲之電流訊號也將逐步下降。因此探討不同脈衝處理時間對清除毒化的效果，實驗結果如圖 (25) 所示，探討施加的時間分別為 0、5、10、15、20、25 和 30 秒共六個，以找尋最適當之脈衝施加時間。由圖中可知當脈衝電壓施加時間為 5 秒時，如上述的說明，會造成電極表面的毒化物質殘留，而使所得的分析結果，變率較 10 秒以上來的大，而脈衝電壓的施加時間超過 10 秒，已可獲得不錯的清除毒化效果，其中又以脈衝電壓施加時間 20 秒時，得到的相對標準偏差的數值最小，其相對標準偏差為 1.28%，最後以 20 秒的脈衝時間當成最佳之操作條件。

電極再生的脈衝電壓強度、頻率與施加的時間探討，至此已詳細探究完畢，在最適化脈衝電壓的處理，即脈衝強度為 0 V ~ 1.4 V，脈衝頻率為 15 Hz，脈衝施加的時間為 20 秒下，偵測乙烯硫脲的再現性皆可控制在  $RSD = 2\%$  以下，已可有效解決電極毒化所產生的問題，接下來將對其餘的操作條件，如乙烯硫脲氧化偵測的施加電位、載流液體的 pH 值、緩衝溶液的種類及濃度、載流液體的流速及注入乙烯硫脲樣品的體積等等作進一步的討論。

## 乙烯硫脲氧化之偵測電位的探討

在獲取乙烯硫脲的偵測訊號，首先需得知其適當的氧化電位，由前述之循環伏安法實驗中，已觀察到乙烯硫脲的氧化訊號是從 0.6 V 開始，因此選擇了 0.6、0.8、1.0、1.1 及 1.2 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) 等五個氧化偵測電位，對乙烯硫脲偵測結果受電位影響的探討。如圖 (26) 顯示，當氧化偵測電位越高，所得到乙烯硫脲氧化電流訊號也越大，與循環伏安法實驗觀察到的現象相符合，然而偵測電位持續提高，電極表面受乙烯硫脲氧化後物質的毒化現象越嚴重，訊號穩定性的掌握越不易，再現性也跟著變差，為保持玻璃碳電極表面的活性及避免水溶液中操作有溶液極限的背景干擾，系統選擇以分析變率相對穩定之 1.0 V 氧化偵測電位為最佳化操作條件。

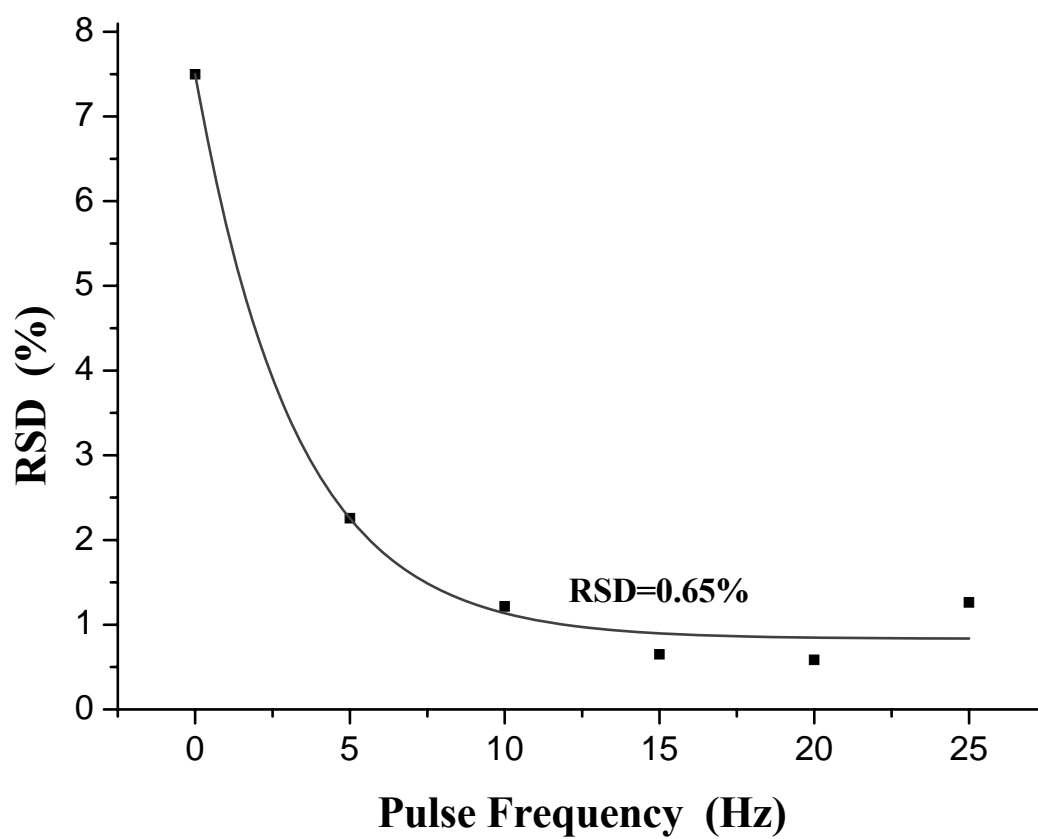


圖 (24) 脈衝頻率的探討。系統以脈衝頻率分別為 0、5、10、15、20 及 25 Hz，作為處理偵測 1 mM 乙烯硫脲後的毒化電極，並觀察其氧化電流訊號的變化，脈衝強度為 0~1.4 V，其餘操作條件與圖 (23) 同。



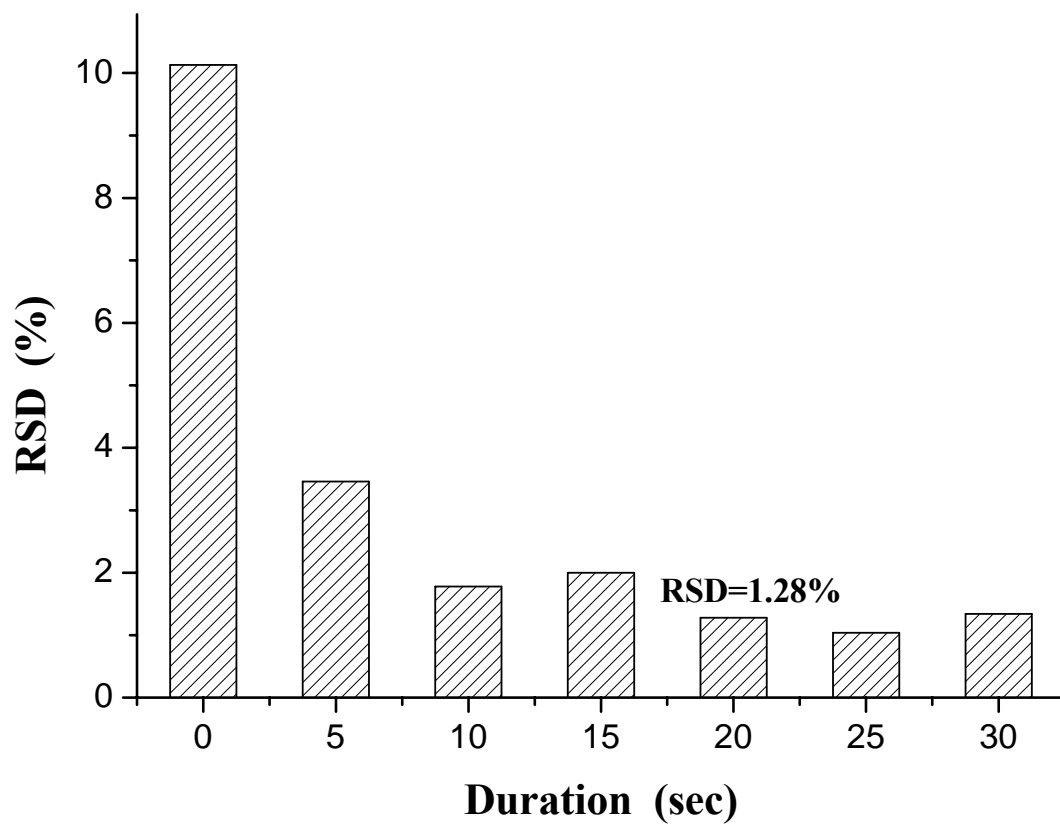


圖 (25) 再生脈衝電壓施加時間的探討。系統脈衝處理時間分別為 0、5、10、15、20、25 及 30 秒，作為處理偵測乙烯硫脲後的毒化電極，並觀察其氧化電流訊號的變化，脈衝頻率 15 Hz，其餘操作條件與圖 (24) 同。

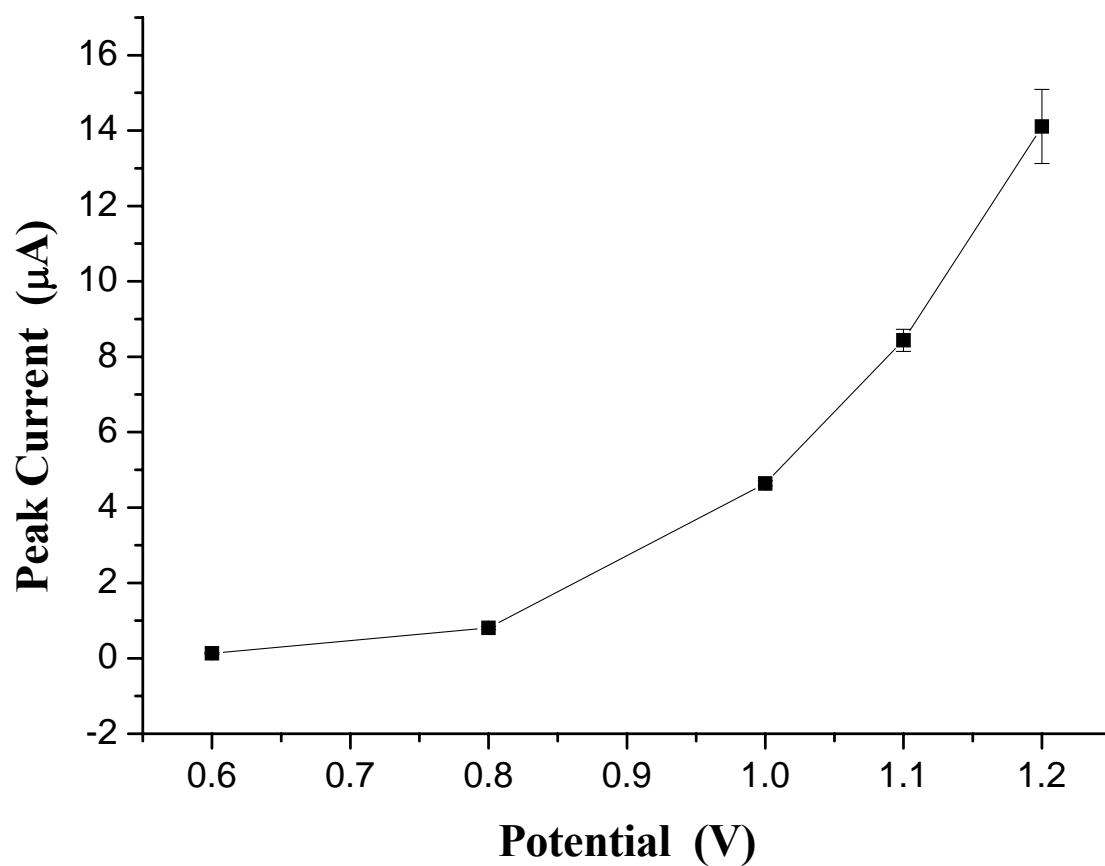


圖 (26) 偵測乙烯硫脲之氧化電位的探討。在圖 (25) 的操作條件，且脈衝清除時間為 20 秒下，探討偵測電位分別為 0.6、0.8、1.0、1.1 及 1.2 V (vs. Ag / AgCl, 3M KCl) 時，所獲得的乙烯硫脲氧化電流訊號。

## 溶液 pH 值探討

電化學反應中緩衝溶液的酸鹼度常在氧化還原反應中扮演著重要的角色，因此本研究也將針對緩衝溶液中，不同酸鹼值對乙烯硫脲氧化訊號的影響作探討。研究選擇了七種酸鹼度做探討，分別為 pH 5、5.5、6、6.5、7、8 和 9，結果如圖 (27) 所示，由圖中發現當為中性溶液 pH 7 時，所得氧化訊號最大且分析之穩定性最佳，相對標準偏差為 1.05%，而溶液偏酸時一般對氧化偵測模式較不利，而使圖中酸鹼度在 pH 5 時氧化訊號變小，另一方面在 pH 9 鹼性溶液中，也會造成氧化訊號的減落，其原因則是乙烯硫脲本身在偏鹼溶液不穩定會降解成其他產物，綜合上述的偵測結論，實驗最後選擇在中性溶液，以磷酸配製成之 pH 7 緩衝溶液作為最佳化操作條件。

## 樣品注入體積的探討

注入乙烯硫脲樣品體積大小也會直接影響偵測訊號大小，甚至影響穩定度，其原因是樣品注入體積較小時，由於樣品注入後分析系統，須經載流液體帶至電化學偵測器，在管路中運送時，樣品濃度會被載流液體給稀釋，因此造成氧化訊號的降低，而注入之樣品體積過大時則可能導致毒化現象加劇與再現性變差。因此實驗探討了乙烯硫脲樣品的注入體積，分別注入 10、20、50 及 100  $\mu\text{L}$  之樣品體積，所得樣品體積與氧化電流訊號圖的關係如圖 (28) 顯示，隨著注入體積的增加，所偵測的氧化電流訊號越大，但當流經電極表面的乙烯硫脲量變多時，氧化後吸附而毒化電極表面的物質也隨著累積，使得電極毒化現象增加而影響偵測訊號的再現性，而且大的樣品體積也不利於分析系統的發展，因此最後選擇 20  $\mu\text{L}$  的樣品注入體積為最適化條件，此時的氧化訊號靈敏度及再現性皆有不錯的表現。

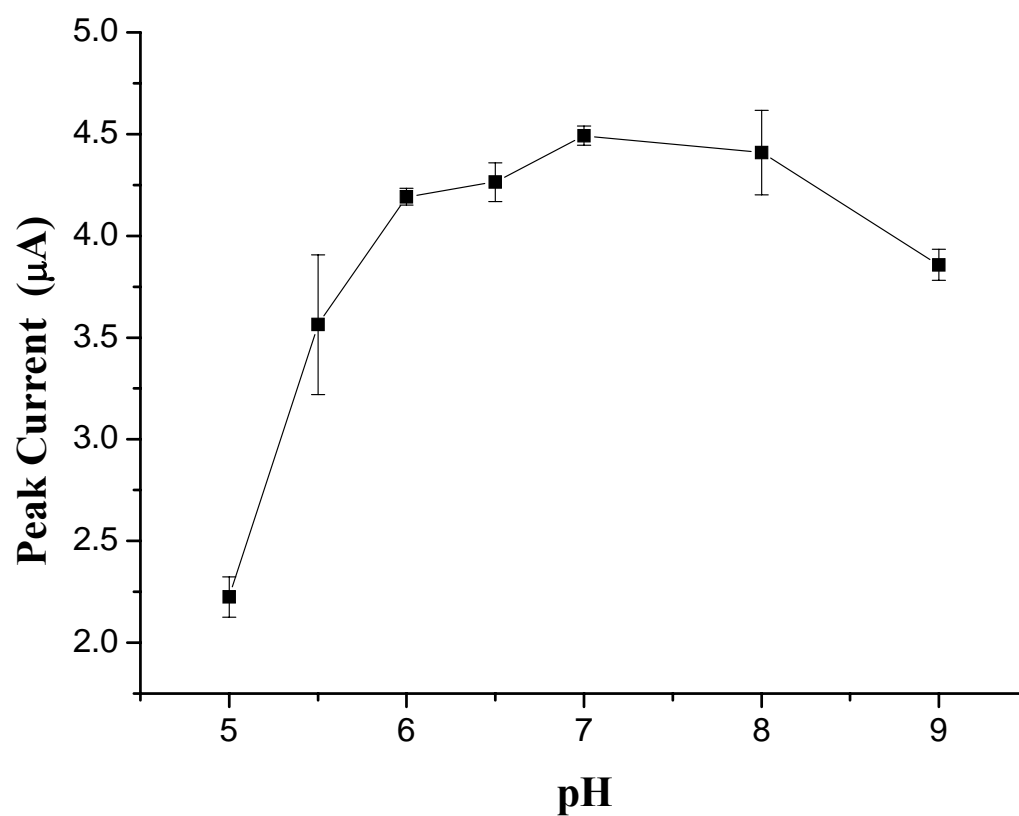


圖 (27) 溶液 pH 值探討。乙烯硫脲分析系統在 pH 值分別為 5 、 5.5 、6 、 6.5 、 7 、 8 及 9 之 0.05 M 磷酸緩衝溶液中，於偵測電壓為 1.0 V 下，偵測 ETU 所得的氧化電流訊號響應，其餘操作條件如圖 (26)。

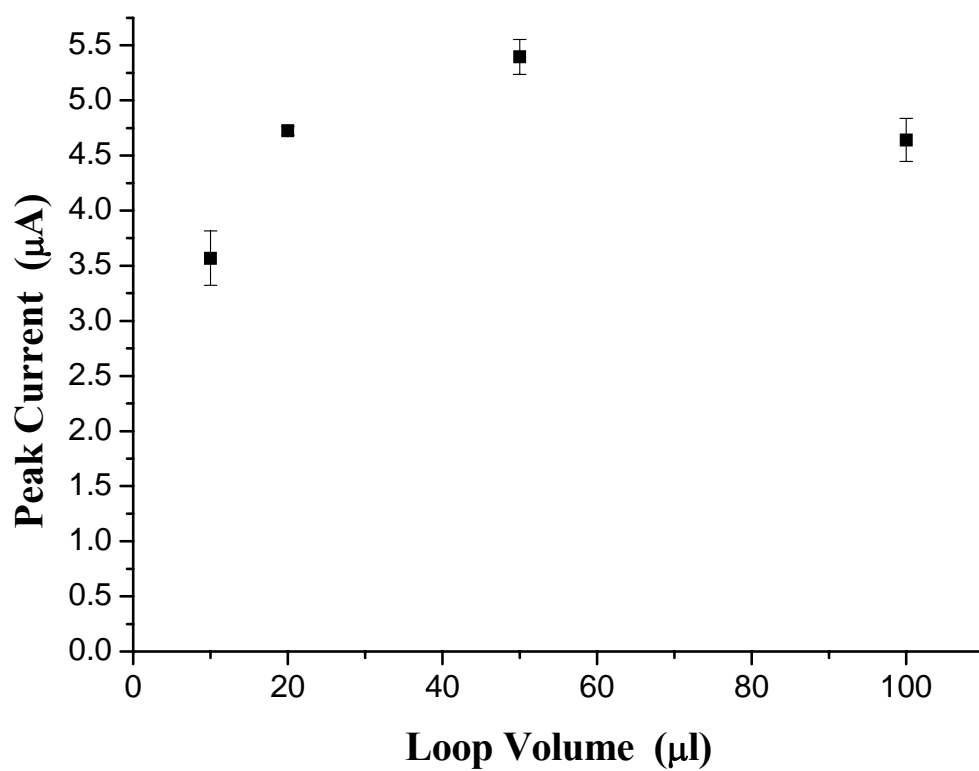


圖 (28) 樣品注入體積的探討。乙烯硫脲分析系統在注入之樣品體積分別為 10、20、50 及 100  $\mu\text{L}$  下，酸鹼度為 pH 7 之磷酸緩衝液中，偵測 ETU 所得的氧化電流訊號變化，其餘操作條件如圖 (27)。

## 載流液體流速的探討

本研究之乙烯硫脲偵測系統，結合了自動化流注分析，並以安培法偵測乙烯硫脲樣品，因此系統之訊號靈敏度與分析物在管路中運送的速度，乃至溶液與電極間的反應皆有著密切的關係，當載流液體流速過慢時，樣品濃度會在注入處到電化學反應槽前被流體稀釋，且當分析物在進行電化學反應時，所得到的氧化電流訊號與此時分析樣品的質傳 (mass transfer) 有絕對之關係，載流液體的流速越快，溶液中的分析物有可能來不及傳遞至電極即被流體帶走，此現象在本薄層 (thin layer) 行為之流注分析系統影響應較不顯著。

有上所述可知利用流注分析系統時，需仔細研究載流液體的流速與偵測訊號間的關係，本實驗探討 0.3 、 0.5 、 0.7 、 1.0 、 1.5 和 2.0 mL/min 共六種流體流速，實驗結果如圖 (29) 所示，在低流速每分鐘 0.3 毫升時，因流速緩慢樣品可能在管路中遭遇緩衝溶液嚴重稀釋，所以氧化電流變小，且每次分析所需的時間家長，使得半峰寬 (half peak width) 有變寬的趨勢；此外因流速變慢，造成分析物之氧化後產物在電極表面殘留較久，毒化電極的現象趨於嚴重，偵測訊號的再現性變差。而流體速度高於 0.5 mL/min 後，所得的乙烯硫脲氧化電流訊號已趨平緩，直到 2.0 mL/min 後訊號才因分析物來不及至電極表面反應而使訊號漸下降，考慮流速 0.5 mL/min 時已有不錯的訊號靈敏度，以及避免載流液體流速快造成樣品的浪費，實驗最後選擇流體流速 0.5 mL/min ，為本研究最佳之操作條件。至此所有操作條件已探討完畢，並整理列於表 (5) 。

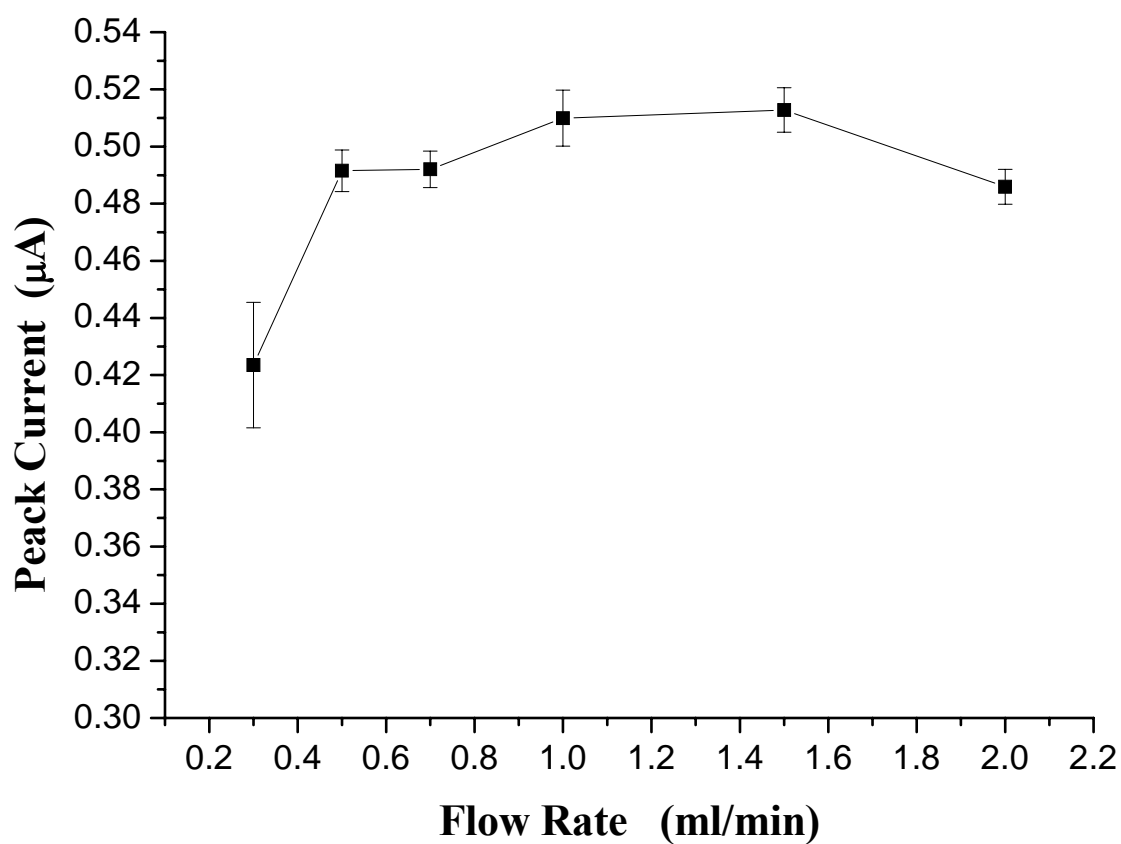


圖 (4-29) 載流液體流速的探討。注入乙烯硫脲的體積為 20  $\mu\text{L}$  下，對流體流速分別為 0.3 、 0.5 、 0.7 、 1.0 、 1.5 及 2 mL/min 做探討，比較 ETU 氧化電流訊號的變化，其餘操作條件如圖 (4-28)。

表 (5) 乙烯硫脲分析系統之最佳化操作條件

最適化參數	最佳化結果
脈衝強度	0 ~ 1.4 V
脈衝頻率	15 Hz
再生脈衝時間	20 sec
氧化操作電位	1.0 V ( vs. Ag/AgCl )
載體流速	0.5 mL/min
溶液酸鹼值	pH 7
緩衝溶液種類	Phosphate
緩衝溶液濃度	0.05 M
樣品注入體積	20 $\mu$ L



#### 4-3-3 分析特性的探討

使用自動化流注分析系統，配合脈衝式電極再生技術，以電化學安培法偵測乙烯硫脲，以最佳化處理電極表面條件之脈衝強度為  $0 \sim 1.4 \text{ V}$ 、脈衝頻率為  $15 \text{ Hz}$  和脈衝施加時間為  $20 \text{ 秒}$ ，以及在  $0.05 \text{ M pH } 7$  的磷酸緩衝溶液、施加  $1.0 \text{ V}$  之操作電位、載送溶液之流速為  $0.5 \text{ mL/min}$  及注入乙烯硫脲之樣品體積為  $20 \text{ L}$  時，連續偵測不同濃度之乙烯硫脲樣品溶液，所得校正曲線如圖 (30) 所示。乙烯硫脲的偵測線性範圍達  $300 \text{ M}$  (correlation coefficient,  $r = 0.9992$ )，偵測極限為  $0.9 \text{ M}$  ( $S/N = 3$ )，在上述條件下連續對  $1.0 \text{ mM}$  乙烯硫脲重複偵測  $20$  次的操作，得氧化電流訊號為  $4.7 \text{ A}$ ，而其相對標準偏差是  $0.82\%$ ，測得之氧化訊號並無明顯下降，而反觀未施加電極再生處理的對照組實驗，其相對標準偏差高達  $9.07\%$  且訊號隨偵測顯著衰減，上述結果顯示利用電極脈衝處理活化電極，用以偵測乙烯硫脲之策略是成功可行的，最後將分析特性結果整理並列於表 (6)。

#### 環境水樣的評估

最後將此自動化偵測系統，應用在環境水樣的分析，實驗研究了兩種環境水樣，分別取自田間 (farm) 及校園內 (campus)，以評估環境水樣中偵測乙烯硫脲的可能性，分別加入  $1.0 \text{ mM}$  乙烯硫脲於上述兩種水樣間質中，並偵測乙烯硫脲樣品之回收率，重複三次的偵測結果分別為  $96\%$  及  $92\%$ ，顯示本系統適合於環境水樣的分析。

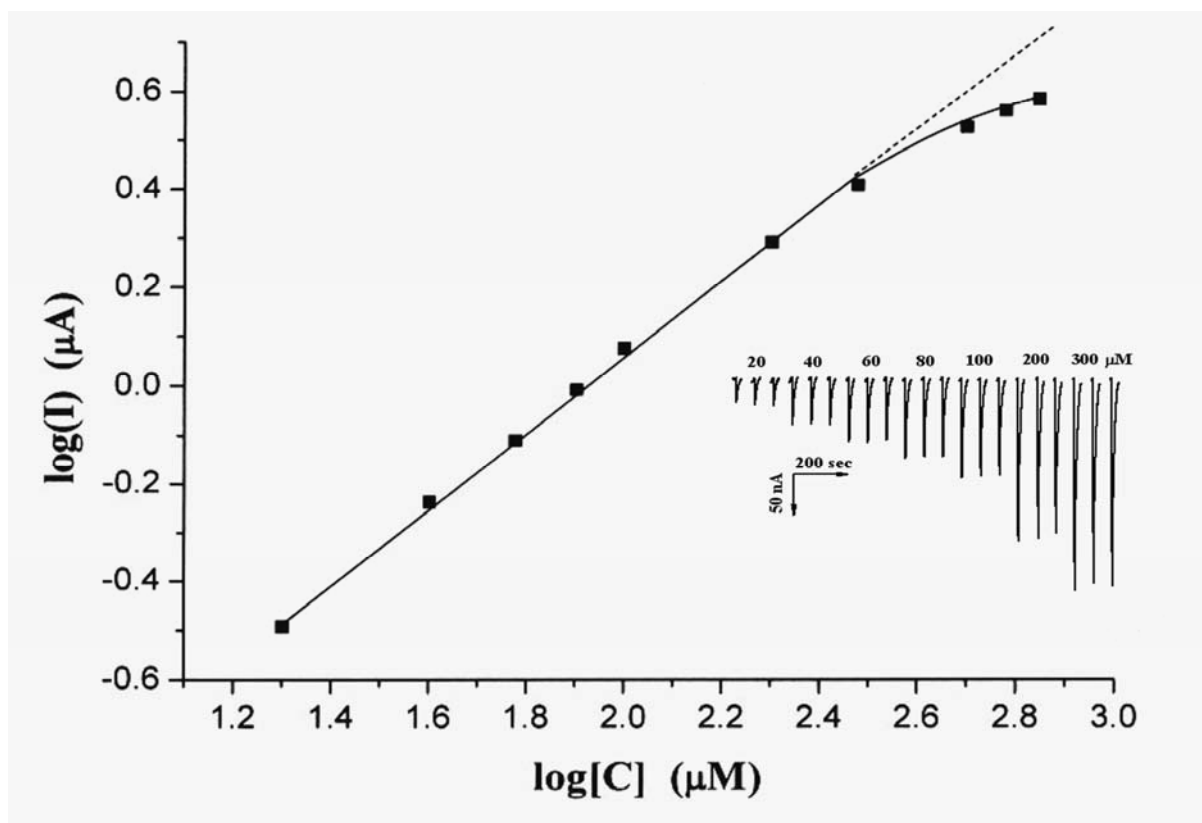


圖 (30) 乙烯硫脲之偵測校正曲線。在最佳化條件：脈衝強度 0~1.4 V、頻率 15 Hz、施加時間 20 秒、偵測電位 +1.0 V、0.05M, pH 7 磷酸緩衝溶液、20  $\mu\text{L}$  之樣品體積、流體流速 0.5 mL/min 下，連續偵測不同濃度 ETU 所得的濃度校正曲線。

表 (6) 乙烯硫脲之分析特性

項目	結果
線性範圍	20 ~ 300 $\mu\text{M}$ ( $r=0.9992$ )
偵測極限	0.9 $\mu\text{M}$ ( $S/N=3$ )
相對標準偏差	0.82% ( $n=20$ )
反應時間	1.2 sec
環境水樣	Farm : 96%
	Campus : 92%

## 結論

本實驗發展了一套自動化流注分析系統，利用個人電腦、LabVIEW 圖控程式、自動注射閥、自組定電位儀及流動注射系統等自行組裝完成，並且配合電化學偵測方法及脈衝式電極再生技術成功的應用在乙烯硫脲的偵測；在監控過程中只需要在程式中輸入各項實驗參數即可讓系統定時偵測乙烯硫脲，得到各項實驗數據，達到長時間監控乙烯硫脲的目的，並且改善了之前施加脈衝再生電極時需要將電極拆卸下來裝在波形產生器 (function generator) 來再生電極的麻煩。使用此套偵測系統在偵測完乙烯硫脲後立即施加脈衝使電極表面再生，電極再生程序完了後即可進行下一次乙烯硫脲的偵測。利用此自動偵測系統不但節省了時間、人力，避免電極在拆卸過程中受到外界污染，達到準確分析乙烯硫脲濃度要求，未來更可以配合網路建構起遠端遙控偵測系統，達到即時監控的功能。

## 第四部份 電激發化學發光之尼古丁農藥偵測系統

### 簡介

電激發化學發光偵測系統具優異靈敏度及選擇性的特性，很適合應用於複雜之環境污染的分析，特別是農藥的分析；許多農藥由其分子結構便可得知其在一般的條件下並不具有電化學活性，或是欲觀察其電反應活性須相當極端的電極施加電位，此時將有大量的電活性物質進行氧化或還原反應，偵測結果之干擾可想而知，甚至會產成複雜的聚合反應並使電極產生毒化 (poison) 現象，使得分析結果的再現性不佳。利用電激發化學發光系統進行農藥分析時，預期將會有多項優點：(1) 電激發化學發光的分析物可以是非電活性物種，如烷基胺類、(2) 偵測的是光訊號，預期電極的毒化現象或電荷平衡所引起的電雜訊干擾較小、(3) 電化學螢光的偵測，靈敏度相當高等等。上述優異的特性，是積極發展電激發化學發光農藥偵測系統的動力所在。

電激發化學發光的方法很多，綜觀這些方法後，實驗選擇以  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  為發光物質之反應機制作為開發農藥分析系統的基礎。理由是此發光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  在水溶液中相當穩定，且反應可產生不錯的放光效率，有助於發展出一套高靈敏度和高穩定性之電激發化學發光農藥偵測系統。利用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  為發光物質行電激發化學發光時，常須搭配共反應試劑的存在，而被熟知的共反應試劑有烷基胺類和草酸等物質，研究將選擇電活性不佳之烷基胺類相關共反應試劑作為分析對象，最後選擇的目標物是人人熟知的毒性物質尼古丁農藥。

### 尼古丁農藥分析的重要性

尼古丁農藥的使用開始於第二次世界大戰時期，當時主要的功能在避免農作物如蔬菜、水果以及穀類等，受到蚜蟲 (aphid) 和白蠅 (white fly) 等等的蟲害。而近年來，由於吸煙人口的增加，菸草工業相當發達，以美國為例在 1997<sup>(128)</sup> 及 2002<sup>(129)</sup> 年的菸草 (tobacco) 總產量分別為 17.9 及 8.8 億磅，雖然因為廣泛性的宣導吸煙的危害，而使產量有所減少但其量還是很驚人，可知人們與尼古丁的接觸有多頻繁。而抽煙者所排放出來的二手煙正充斥在我們的生活週遭，並已嚴重影響人體的健康，且許多研究已明確證實，不論一手或二手煙之菸害，皆會導致癌症的發生，已被國際癌症研究組織 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 歸類為 Group 1<sup>(130)</sup>，其歸類共分為五級，分別是 Group 1、2A、2B、3 及 4 級，其中 Group 1 表示被研究的物質確定會使人類致癌，是對人類危害最嚴重一群。而其對心肺功能等也同樣會產生令人擔心的負面效應，相關疾病<sup>(131)</sup>如：肺癌、膀胱癌、口腔癌、咽喉癌、食道癌、腎臟疾病和心臟病<sup>(132)</sup>等，其煙霧中的化學物質高達 250 種，而主要的致癌物質便是尼古丁或其相關衍生物。

尼古丁為一種難聞，味苦且是無色透明的油質液體，揮發性強極容易透過口鼻而被人體吸收，並造成腦中控制情緒、性慾和睡眠等區域的退化，而且對中樞神經系統<sup>(133)</sup>有極強的毒性。尼古丁也是香菸中主要成分之一，其具有高度的成癮性，在足夠的份量下，尼古丁令人上癮的能力甚至可以媲美高純度的可卡因 (cocaine)，除了易讓人上癮外，尼古丁還會引起許多讓身體不適的徵狀，例如：血壓上升、心跳加速 (每支香煙平均會使脈搏加快 15~20 下)、暈眩、腎上腺素分泌增多、食慾不振及消化不良等。而

長期吸入尼古丁更會導致工作能力減低、失憶、腦細胞癱瘓以及腦中風等腦部<sup>(134,135)</sup> 疾病；此外，尼古丁會使血小板黏性提高，加速血液凝固，所以容易造成血凝塊而阻塞血管，引發心肌梗塞等等。行政院衛生署九十二年台灣地區 10 大主要死因，心臟疾病死亡者佔第三位，而因肺炎死亡者也高居第七位，尼古丁無疑地是主要的兇手。

尼古丁對鼠類之動物實驗顯示它的急毒性半致死量為  $LD_{50} = 50 \text{ mg/kg}$ ，在美國環境保護署的分類中又屬最高之一級毒性物質，並已將環境中香菸煙霧列為『A級人類致癌物質』，其中主要的有毒物質與致癌物就是尼古丁，基於它對人類的高度傷害性以及對環境的污染危害，本章希望於能對環境中尼古丁農藥的含量或藉由人體血液或尿液測定，以有效評估尼古丁物質對人類影響，並進一步加以防範以降低其對人體的毒害。

## 尼古丁農藥的偵測方法

生活週遭中不論是我們所呼吸的空氣<sup>(136)</sup>或是所食用的蔬果如蕃茄和馬鈴薯等等，甚至所喝的茶飲，常被檢測出含有毒性物質尼古丁的存在，影響所及自然不在話下；加上現今社會的吸菸人口眾多，使尼古丁對人體毒性傷害和環境危害的影響加鉅，而相關之研究評估大量的被報導，因此發展一套高靈敏度且可適用在環境及人體體液之尼古丁偵測方法是刻不容緩的。

Leete<sup>(137)</sup> 在茄類植物中發現尼古丁的存在，而此植物分類中囊括了 12 科 (families) 與 24 屬 (genera) 的植物，這些植物包含日常生活中常食用的蔬果如番茄、馬鈴薯和茄子等；而 Osler<sup>(138)</sup> 的研究中發現胡椒及茶葉等也都有尼古丁的存在，常食用含有尼古丁的蔬菜或飲料之非吸煙者民眾，也會因吸收過多的尼古丁，而導致健康的危害。在 1991 年 Biochem 等人使用氣相層析法搭配質譜儀分析蕃茄、馬鈴薯與茶中尼古丁含量分別為 7.3、15 與 100 ng/g，而有的茶中甚至高達 285 ng/g。Siegmund<sup>(139,140)</sup> 在 1999 年使用氣相層析法搭配質譜儀當偵測器，發展出偵測食物中尼古丁的方法，結果指出蔬菜中尼古丁含量大約為 2 - 7  $\mu\text{g/kg}$ 。而在 1996 年 13 個歐洲國家與美國在蒙地卡羅會議中決議每日的尼古丁攝取量分別為 1.4  $\mu\text{g/kg}$ 、2.25  $\mu\text{g/kg}$ 。

由上述例子更讓我們明確知道，尼古丁普遍存在於食物與環境之中，而近年來吸菸人口的增加，使得空氣環境中存在過量的尼古丁污染，而生活環境中的香菸煙霧更是室內污染主要來源，且現今分析尼古丁的方法可分成光譜法、質譜法及生化感測器等。

### (1) 光譜法

在 1999 年 Al-Tamrah<sup>(141)</sup> 將尼古丁溶在含有過錳酸鉀氫氧化鈉之水溶液中，利用光譜儀測出溶液在 610 nm 的吸收值，並定量尼古丁。利用比爾定律 (Beer's law) 求出上述溶液之線性濃度範圍為 0.1 ~ 7.5 g/mL，並測得尼古丁偵測極限為 0.08 g/mL、標準偏差為 2.2% (n=10)。此分析方法可有效的應用在香煙中尼古丁的快速測定。1998 年 Oddoze<sup>(142)</sup> 等人，使用固相萃取尿液中的尼古丁後，使用高效能液相層析法結合分光光度計作偵測，在 20 mL 尿液樣品中，偵測極限達 5 ng/mL、線性範圍為 50 to 5000 ng/mL，偵測尼古丁其分析樣品的回收率為 47 ~ 86%。

## (2) 質譜法

質譜法近年來被廣泛的運用，因為它本身具有許多優點，包括：高靈敏的分析特性、對複雜樣品的分析選擇性佳，加上可與許多的分離技術做巧妙的結合，像是氣相層析儀、液相層析儀及毛細管電泳儀等等，使它的應用性與日遽增，在此要介紹它結合氣相層析法、液相層析法及毛細管電泳於尼古丁測定的實例。

### 氣相層析法

James<sup>(143)</sup> 等人利用氣相層析法搭配質譜儀，分別偵測在血液及尿液中所含的尼古丁和古丁尼 (cotinine) 濃度，分析物與內標準物分別以液液萃取方式處理，經離心和汽化在氣相層析儀分離後，以質譜儀進行偵測，結果顯示尼古丁和古丁尼的偵測極限濃度皆可達 0.16 ng/ml，觀察此法的優點有分析速度快、操作方法簡單及靈敏度高。

Siegmund<sup>(144)</sup> 等人則同時利用氣相層析法及高效能液相層析法搭配質譜儀來量測唾液 (salivary) 中古丁尼濃度，希望利用此數據可以和每日攝入尼古丁或古丁尼的量，建立起某一程度的關係，以作為評估尼古丁在人體內的含量及其對人體產生的效應，此方法可測得唾液中古丁尼濃度為 0.022 ng/mL，是此時期可測得最低濃度的方法。

Cognard<sup>(145)</sup> 等人在 2003 年，利用固相萃取法萃取血液及尿液中的尼古丁，使用氣相層析法結合質譜偵測，此偵測法線性達到 1000 µg/L、偵測極限達 10 µg/L 此固相萃取方法解決了液相中低濃度尼古丁的測定問題。Davoli<sup>(146)</sup> 等人同樣的利用固相萃取法萃取血液中的尼古丁，並以氣相層析法結合質譜測定血液中尼古丁含量，在含有 0.5 ng 尼古丁之 1 mL 血樣中，測定精確度範圍為 1.64% 到 13.3%，偵測極限達 4.16%，此方法的優點為快速的偵測，其已應用在新的生物檢定法及低劑量的尼古丁嚼片測定。在 2002 年 Shin<sup>(147)</sup> 等人，亦使用固相萃取法萃取血液、尿液及唾液中尼古丁，使用氣相層析法結合質譜偵測，此偵測法校正曲線線性範圍為 1~10000 ng/mL，在尿液、血液、唾液偵測極限分別為 0.2 ng/mL、1.0 ng/mL 及 1.0 ng/mL。

### 液相層析法

Stolker<sup>(148)</sup> 等人，利用液相層析法結合串聯質譜法 (tandem mass spectrometry) 來測定老鼠血漿中的尼古丁及古丁尼的濃度，利用二氯甲烷萃取老鼠血漿中尼古丁後，將樣品行減積濃縮，並加入適量鹽酸以避免尼古丁隨有機物快速揮發，隨後經液相層析法分離，以串聯質譜儀偵測尼古丁含量，線性範圍為 1~60 µg/L，在此濃度區間重複操作四次之相對標準偏差在 5~12% 間，且其偵測極限低至 1 µg/L。

同一時期，Scherer 也利用了液相層析法結合串聯質譜儀應用於尼古丁的分析，此篇研究的樣品來自於尿液，並探討了尼古丁在人體的代謝模式，研究並指出吸菸者的尿液可檢測出八種的尼古丁代謝產物，此方法的分析結果與過去使用氣相層析儀搭配氮磷偵檢器 (GC-NPD) 的常用分析法，有相當好的吻合性，而且此法的樣品前處理與層析時間總共只須 3 分鐘，適合分析大量的人體生物檢測研究。

## 毛細管電泳

Clench<sup>(149)</sup> 等人，結合毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE) 和質譜的方法，同樣用來分析尼古丁及其八種代謝產物，尿液樣品先經固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE) 處理，經 C18 - SPE 萃取後之樣品濃度可提高至原本的兩百倍，且分析樣品回收率為 98%；而在此使用膠電泳的訊號峰效率 (peak efficiency) 又比傳統的區塊電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE) 多了 132 倍，使用上述模式偵測尿液中的尼古丁及古丁尼，其偵測極限可分別達 0.55 和 11.25 ng/mL。

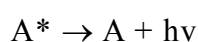
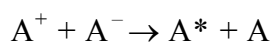
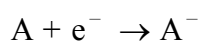
### (3) 生化感測器

在 2001 年 Campanella 等<sup>(150)</sup>，利用丁醯基膽鹼酯酶 (butyrylcholinesterase) 與丁醯基膽鹼 (butylcholine) 作用產生膽鹼 (choline) 後，利用 choline oxidase 氧化使產生過氧化氫並利用安培法測量。而此反應加入尼古丁後會抑制過氧化氫的生成，相對的過氧化氫之反應電流便隨之遞減如此間接地測定尼古丁含量。

在 2001 年 Tan<sup>(151)</sup> 等，在電極上 coating 高分子印膜聚合物 (molecularly imprinted polymer)，在利用尼古丁濃度的不同，會使石英震盪器產生不同的震盪頻率，去測定血清及尿液中尼古丁含量。其線性達  $5.0 \times 10^{-8}$  到  $1.0 \times 10^{-4}$ 、偵測極限為  $2.5 \times 10^{-8}$  M。

綜合上述方法定量尼古丁時，常有使用之儀器設備昂貴或分析靈敏度不夠的問題，因此本研究欲利用電激發化學發光法 (Electrogenerated Chemiluminescence, 電激發化學發光) 來發展尼古丁的偵測，主要的理由是電激發化學發光技術具備分析樣品時有良好的選擇性、高靈敏度及系統簡單等多項優點，預期若能發展成尼古丁偵測系統，將可獲得優異的分析結果。

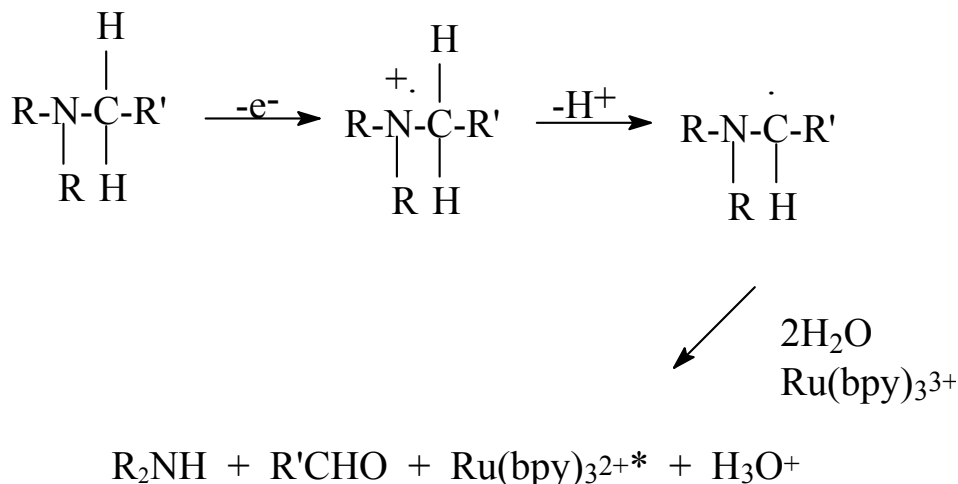
電激發化學發光之反應可以簡單以下列反應式說明：



而  $[Ru(bpy)_3]^{2+}$  是最常被用來應用於化學發光 (CL) 及電激發化學發光 (電激發化學發光) 的化合物，過去它已被用來作為草酸根 (oxalate)、胺類 (amine)、胺基酸、NADH 和藥物等等的偵測，其放光及氧化還原反應之特性已有很多的研究。1996 年 Preston 和 Nieman<sup>(Anal. Chem. 1996, 68, 966-970)</sup> 提出一電激發化學發光探針，實驗設計一分析槽使工作電極與光纖束上下相對且僅相隔 3 mm，利用光纖束將工作電極上產生的光直接導入 PMT 作偵測，並將此設計用於過氧化氫及葡萄糖的偵測。應用電激發化學發光作為分析的技術上，其偵測的靈敏度會受到電激發化學發光放光效率 (efficiency) 的影響，為了增加電激發化學發光放射光的強度，該分子於偵測環境下之穩定性及生命期，將影響到放射光之時間及強度。因此，若要延長電激發化學發光放光的時間則必須要選擇適當的反應物種及最適化之反應條件，以使此兩個反應物種具有相對的穩定性。電激發化學發光應用  $Ru(bpy)_3^{3+}$  於在烷基胺類 (aliphatic amine) 的偵測<sup>(Anal. Chem. 1987,</sup>



59, 865-868) 時，放光效率以三級胺類最佳，一級胺類最差。其中三級胺類與  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  反應機制如下：



胺類化合物要有電激發化學發光活性通常在  $\alpha$  碳上必須具有一個氫原子存在。而在 amine 分子中接近自由基中心若具有拉電子取代基如 carbonyl、halogen 或 hydroxyl 存在，將傾向於減少電激發化學發光放光的強度。相反的若具有給電子取代基存在如 alkyl chain 將傾向於增加電激發化學發光放光的強度。Aromatic amine 共振穩定 radical intermediate 使得其反應性降低而降低電激發化學發光活性。由上述的觀點作出發點，發展出一套靈敏且準確的電激發化學發光偵測系統，並應用於尼古丁的定量是相當可以期待的。而本研究希望於藉由測量環境中水樣品之尼古丁含量檢測農藥殘留量，以監控農藥使用情形，並保障食品的安全，避免人體健康受到危害，且有效的防止疾病的發生。

## 實驗部分

### 儀器

本實驗使用的電激發化學發光系統之儀器設備如圖 (31) 所示，主要包含自製的定電位儀及電化學反應槽、光電倍增管 (photomultiplier tube, PMT) (ORIEL, 70680, USA)、光電倍增管之電源供應器 (ORIEL, 70705, USA)、電流前置放大器 (preamplifier) (ORIEL, 70710, USA)、自動流動注射系統 (automated flow injection analysis, AFIA)、訊號擷取程式 (LabVIEW, National Instruments, USA) 和介面卡 (National Instruments, PCI-6014, USA) 等，整套光電系統是利用定電位儀提供工作電極適當的反應電位，使發光物質與共反應試劑進行複雜的電子得失反應，而反應最後產生的螢光經由光電倍增管將訊號放大後再行輸出，最後再經由電流前置放大器將電流訊號轉換成電壓訊號，傳送至資料擷取 (data acquisition, DAQ) 卡並以 Labview 程式將收集的數位訊號做有效的數據處理。而自動流注系統包含蠕動幫浦 (MASTERFLEX, 7712062, Barnant company, USA)、自動注射閥 (auto-valve) (VICI, ETMACE, USA)、樣品迴路 (sample loop) (VICI, USA)、流體樣品電化學反應槽 (flow cell, home made)。電化學樣品反

應槽的三電極系統如圖 (32) 所示，工作電極是用氧化銦錫 (indium tin oxide, ITO) 導電玻璃，參考電極為銀/氯化銀 (Ag/AgCl, 3M KCl)，而對偶電極是白金。

實驗中精密微量溶液體積則是 10-100、20-200、100-1000、500-2500、500-5000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Eppendorf varipette 4810, Hamburg, Germany) 及 1-5 mL 吸量管 (Jencons, Jencons Sealpette, PA, USA) 來分別量測。溶液酸鹼度值則是利用 pH meter (Sun-tex, SP-701, Taiwan) 進行量測；而藥品重量的量測上，以微量天秤 (Mettler, AE-200, Greifensee, Switzerland) 秤取藥品，可精確秤量至 1.0 mg。

## 藥品

本實驗中水溶液的配製皆使用二次去離子之超純水，MilliQ Reagent Water System (Millipore, Milli-Q, Massachusetts, USA)；所使用的發光反應物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{Cl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) chloride, hexahydrate) 購自 (Aldrich, Wisconsin, USA)，而  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  之分子結構可參照圖 (33)，分析之標準物尼古丁 ((-)-Nicotine, 圖 (34) 購自 Riedel-deHaën (Seelze, Germany)；實驗中選用的緩衝溶液有磷酸氫鈉 (di-sodium hydrogen phosphate-2-hydrate, phosphate) 和磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate) 亦購自 Riedel-deHaën，胺基甲烷三甲醇 (tris(hydroxymethyl) aminomethane, Tris) 購自 (Mallinckrodt, Kentucky, USA)，而碳酸氫鈉 (sodium hydrogen carbonate) 及硼酸 (boric acid) 皆購自於 Junsei chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)；而用來評估環境中干擾物的代表物質 SDS、Humic acid 及 Camphor 皆購自於 (Aldrich, Wisconsin, USA)。用來萃取尿液樣品的二氯甲烷 (dichloromethane) 溶劑購自 Junsei chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)。

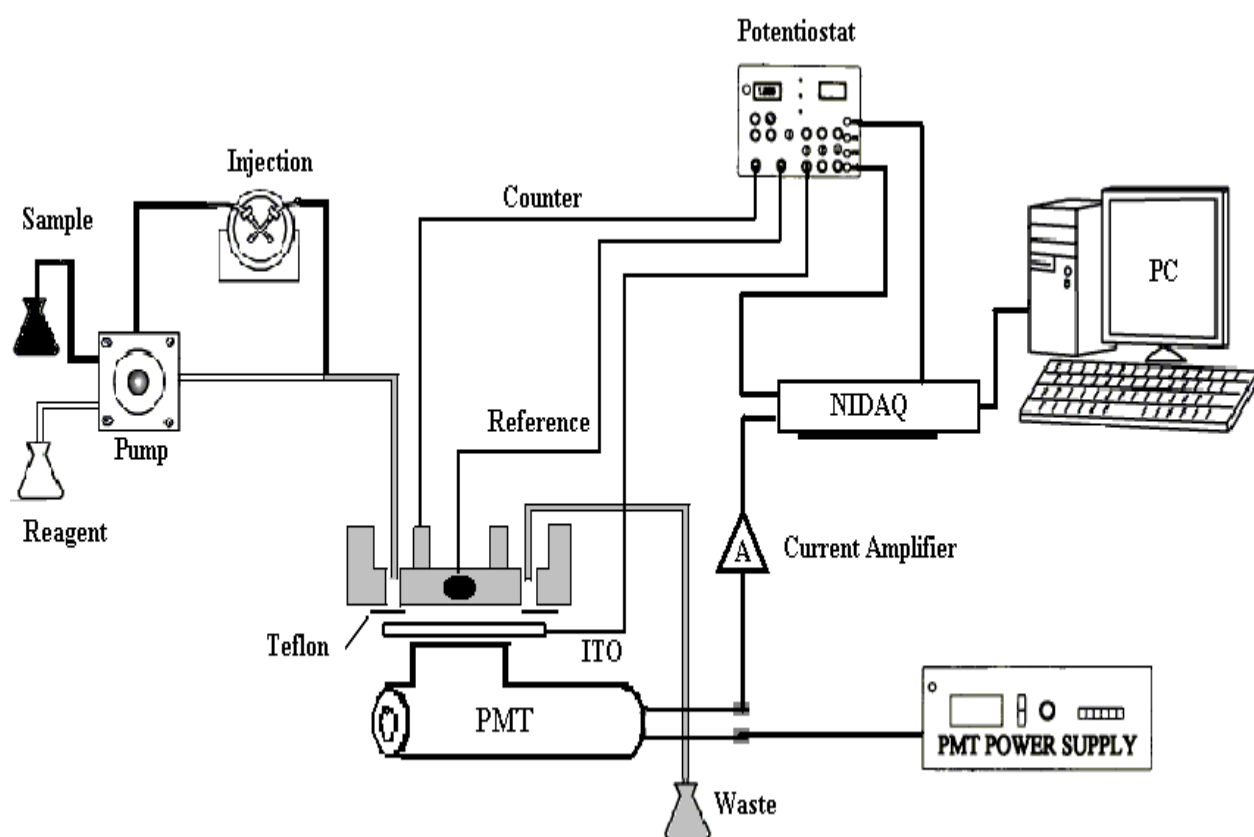


圖 (31) ECL/ AFIA 之儀器裝置圖。

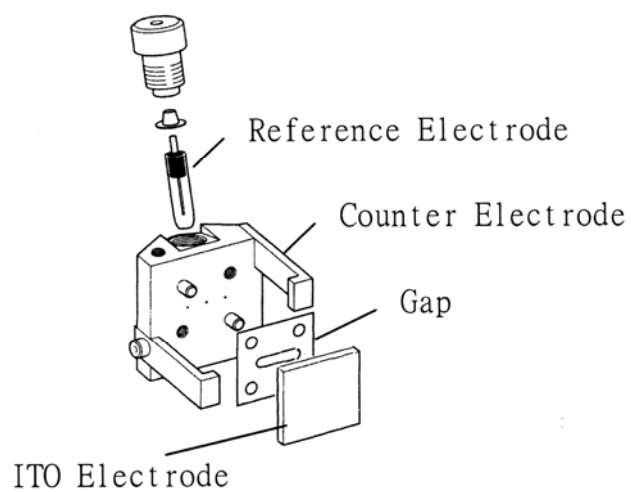


圖 (32) 電化學反應槽中的三電極系統裝置。

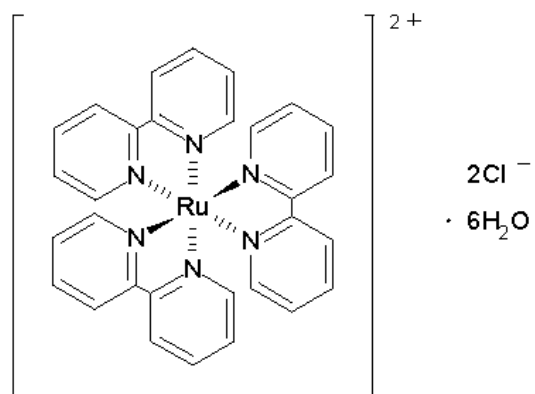


圖 (33)  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  之結構。

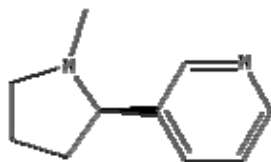


圖 (34) 尼古丁之結構。

## 實驗步驟

本實驗利用  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  為電化學發光物質，直接溶在 pH 8 之磷酸緩衝溶液中，置在溶液槽中，共反應物 (coreagent) 尼古丁作為還原劑，亦溶在相同的緩衝溶液中，置於樣品槽中，經由蠕動幫浦的帶動下，將  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  和尼古丁帶到三電極反應槽中，在施加電位 1.4 V (vs. AgCl/Ag) 下，產生放光之反應，反應所放出的光經由光電倍增管 (PMT) 將光訊號轉換成電訊號，之後再經由電流前置放大器，將所產生的電壓轉換成電流訊號，最後利用 Labview 程式擷取訊號並作數據處理。實驗中使用的 ITO 工作電極先分別浸泡於丙酮及乙醇溶液，並置於超音波震盪洗滌槽中處理三分鐘，最後再以去離子水沖洗備用。

偵測條件的探討包括施加電位的探討，並利用循環伏安法來證明  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  適當的氧化電位，其他實驗的最佳化操作條件包含溶液流速的探討、樣品迴路體積的探討、緩衝溶液酸鹼值的探討、緩衝溶液種類的探討、緩衝溶液濃度的探討、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  濃度的探討、干擾物探討、分析特性評估。

## 結果與討論

### 工作原理的探討

本研究中所施加的操作電位，目的在氧化放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，以利後續與尼古丁行進一步的放光反應，因此  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  和尼古丁的電化學反應特性，將主導電激發化學發光反應機制的進行與否，對電反應特性有深刻瞭解後，將有助於發展此電激發化學發光系統。首先實驗先以電化學循環伏安法作為瞭解反應特性的工具，將 ITO 電極置於含有 1.0 mM 尼古丁和 0.1 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的 0.1 M, pH 8 磷酸溶液中，進行循環伏安法的實驗，掃描之電位區間為 0 ~ 1.6 V (vs. Ag/AgCl, 3M KCl)，掃描速度為 100 mV/sec，結果如圖 (35) 所示，此圖可分成兩個部分，上圖標準的循環伏安圖，下圖是電位掃描時同步接收尼古丁反應時放出電螢光訊號，如此可明確得知讓電激發化學發光進行所需施加的氧化電位，即  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  本身的氧化電位；其中 (A) 與 (B) 組實驗分別為不含與含有 1.0 mM 尼古丁溶液中所做的比較，由上圖之循環伏安法實驗得知，當氧化電位高至 1.0 V 後可明顯觀察到  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  開始氧化，而且可看出一對可逆的氧化還原峰 (如圖 34 上, A)，而加入尼古丁後，由於  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  之氧化產物  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  催化尼古丁的氧化，使得尼古丁的氧化電流在  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的氧化電位上急劇增加 (如圖 34 上, B)；再由電位掃描時同步觀察電激發化學發光的結果，同樣在氧化電位高至 1.0 V 後，含尼古丁實驗組之電激發化學發光強度快速增加 (如圖 34 下, B)，反之不含尼古丁之溶液，並不會產生任何電螢光的訊號 (如圖 34 下, A)。由上述循環伏安圖及電螢光訊號所得結果可知，實驗之氧化操作電位須施加高至足以讓  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  氧化才可使電激發化學發光進行，而系統最後將採用定電位偵測模式，基於上述的瞭解，將選取適當的電位範圍進行最佳化操作電位的探討。

## 最佳化條件的探討

本研究目的是建構一電激發化學發光 (Electrogenerated Chemiluminescence, 電激發化學發光) 系統以運用於三級胺類尼古丁農藥的偵測，並選擇搭配流注分析裝置，以達到分析快速及便利的要求，結合電化學方法施加適當的電位於 ITO 電極上，促使發光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  氧化後與共反應物尼古丁作用後放光，以達到定量尼古丁的目的，為確保整個系統在最佳環境下操作，研究詳盡探討了可能影響之偵測條件，包括：氧化  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  反應施加的電位、流速的探討、樣品迴路體積的探討、緩衝溶液 pH 值的探討、緩衝溶液種類的探討、緩衝溶液濃度的探討、放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  濃度的探討等等，祈使此偵測系統可得到最佳分析結果。

## 操作電位之探討

電激發化學發光的偵測方法，系統操作電位直接影響偵測時的靈敏度，由循環伏安法實驗中得知，如果施加之氧化電位不足則無法氧化  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，以致於無法進行放光反應，而適當的提供足夠的氧化電位，可使  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  之氧化效率提高，同時可增加偵測時系統的靈敏度。基於上述循環伏安法之實驗結果，本實驗選擇對於 1.0、1.1、1.2、1.3、1.4 和 1.5 V 等六個不同的氧化操作電位加以探討，以獲得最佳之尼古丁偵測電位。偵測系統之其它操作條件：電化學三電極系統是以 ITO 為工作電極、銀/氯化銀為參考電極、白金為輔助電極，而流注系統之載流液體為 0.1 M, pH 8 磷酸緩衝溶液內含 0.1 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，樣品迴路體積為 20  $\mu\text{L}$ ，流速為 1 mL/min 的條件下偵測 50  $\mu\text{M}$  尼古丁反應生成的光電流。由圖 (36) 知氧化電位探討的起始電壓為 1.0 V，而隨施加電壓的增加，可看出光電流也隨之迅速上升，電位增加至 1.2 V 後，光訊號漸漸趨於平緩；當電位到達 1.4 V 後，訊號到達較佳的穩定狀態，與循環伏安圖的結果相近，最後選擇氧化電位 1.4 V (vs. Ag/AgCl) 為偵測的最佳操作電位。

## 載流液體流速之探討

載流液體的流速會影響分析物在管路中的擴散程度及反應物與電極表面間的氧化還原反應的電子傳遞效果；當載體流速過慢時，分析物會在傳輸管路中擴散，使訊號的半波寬 (Half peak width,  $W_{1/2}$ ) 變寬及訊號峰降低的現象，會造成樣品分析時間變長及分析靈敏度變差的不良後果。而流速太快卻會使載流液體流失體積增加，讓溶液中的反應試劑消耗過大，當流速過大也可能會使電極表面產生之氧化還原物種，因反應尚不完全即被載流液體帶走而使訊號變小。由圖 (37) 可看出流速為 1 mL/min 時，操作系統有較佳的訊號，故之後選擇以流速 1 mL/min 之操作條件，繼續做以下參數的探討。

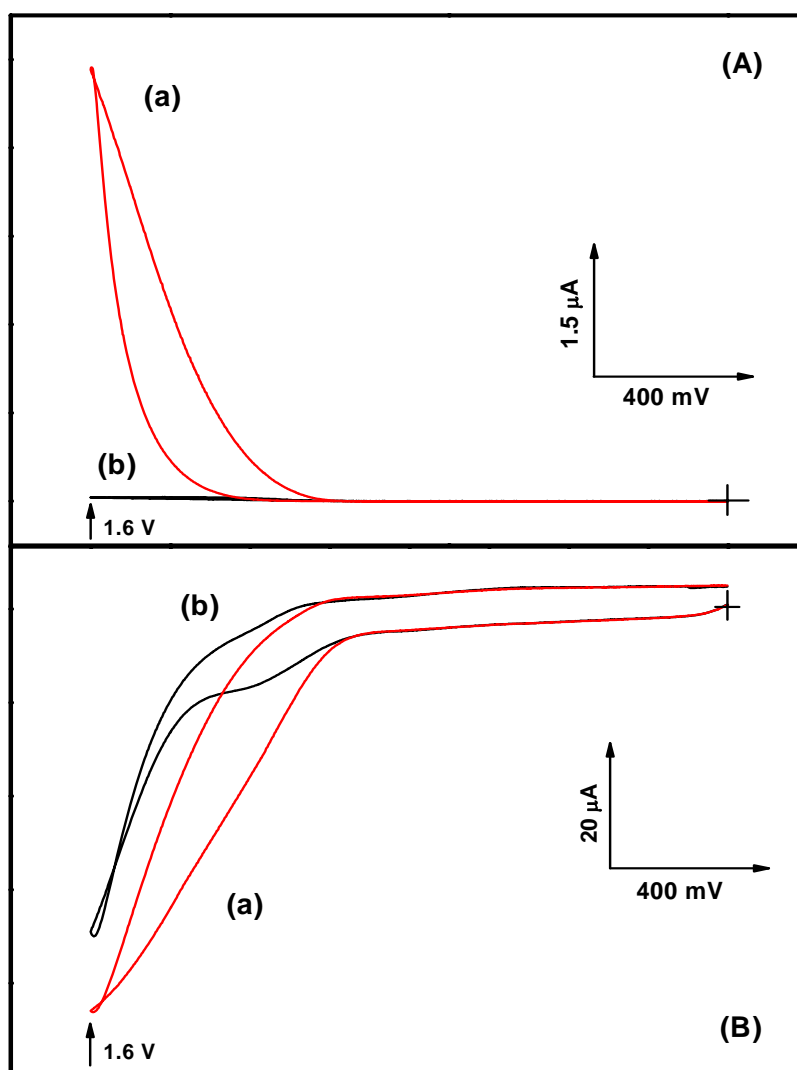


圖 (35) 尼古丁偵測系統之循環伏安圖及電激發化學發光圖。以循環伏安法在電位區間為 0.0 ~ 1.6 間，掃描速率 0.1 V/s 下，同時觀察 50 (a) 及 0  $\mu\text{M}$  (b) 尼古丁溶液之光 (A) 及電化學電流訊號 (B)，其他操作條件為：光電化學三電極反應槽是以 ITO 為工作電極、銀/氯化銀為參考電極和白金為輔助電極，而流注系統之載流液體為 0.1 M, pH 8 磷酸緩衝溶液內含 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  mL/min。

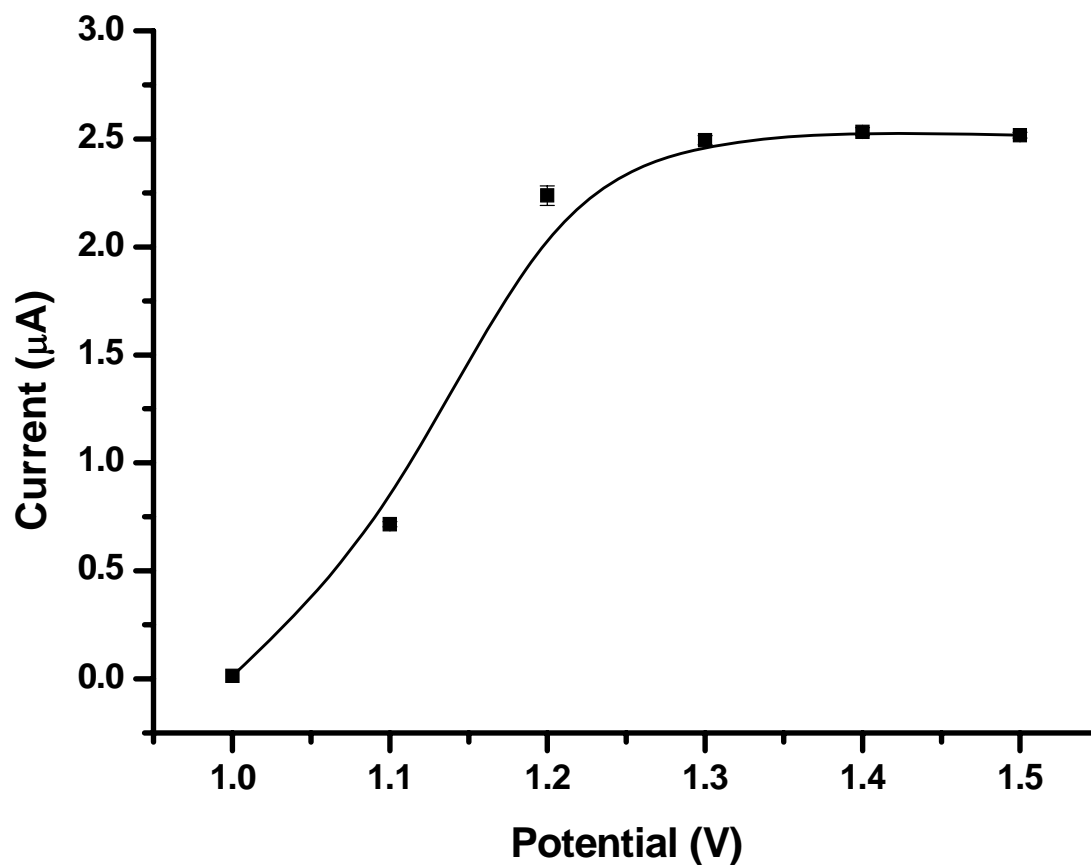


圖 (36) 尼古丁偵測系統之操作電位的探討。在電位區間為 1.0 ~ 1.5 間，偵測 50  $\mu\text{M}$  尼古丁反應所生成的光電流，其他操作條件為：光電化學三電極反應槽是以 ITO 為工作電極、銀/氯化銀為參考電極和白金為輔助電極，而流注系統之載流液體為 0.1 M, pH 8 磷酸緩衝溶液內含 0.1 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，樣品迴路體積為 20  $\mu\text{L}$ ，流速為 1 mL/min。



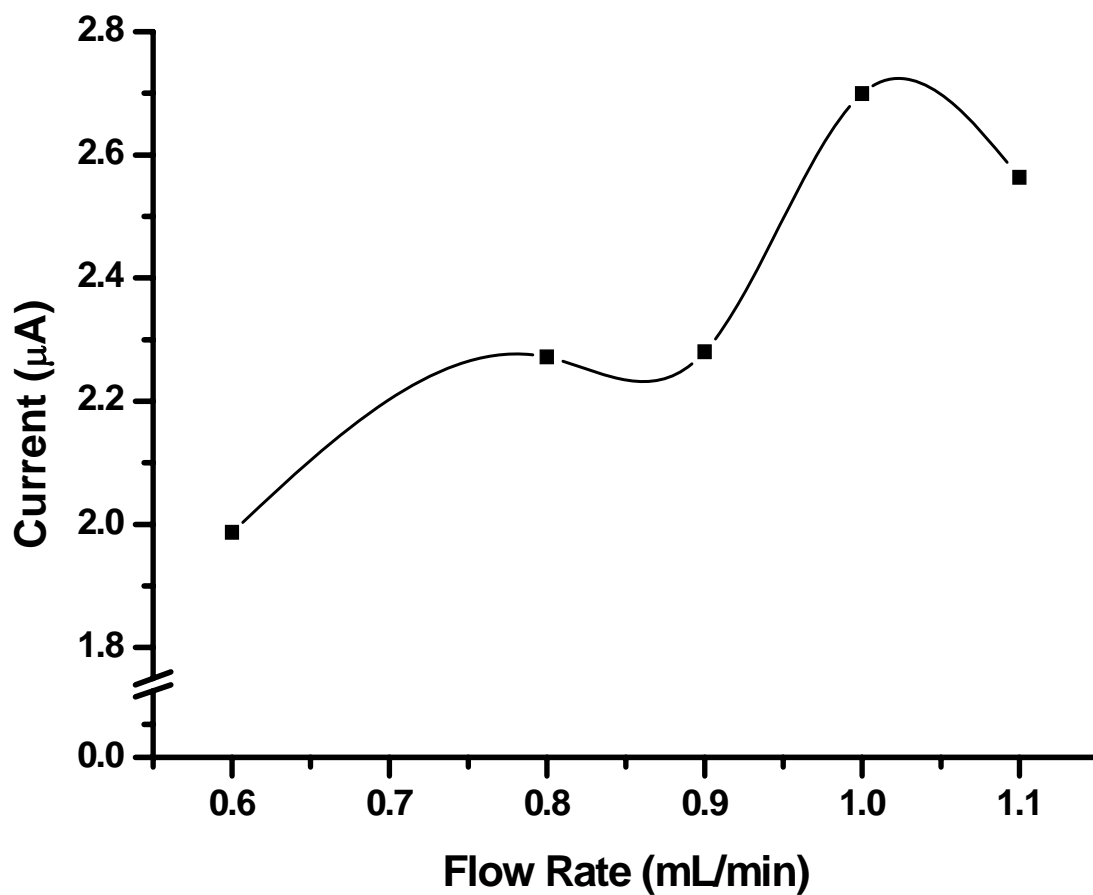


圖 (37) 載流液體流速的探討。圖中顯示尼古丁偵測系統之載流液體流速變化對分析訊號的影響，流速變化控制在 0.6 ~ 1.1  $\text{mL/min}$  間，施加氧化電位為 1.4 V，而其他的操作條件則如同圖 (36) 所示。

## 溶液酸鹼值之探討

溶液中的酸鹼值與本實驗之電激發化學發光系統，其反應機制<sup>(Anal. Chem. 1987, 59, 865-868)</sup>中牽涉  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  與其中間產物須和共反應試劑三級胺類作用，而三級胺類身上之氮原子的未共用電子對，對氫離子具相當的活性，即有不錯親和性；而尼古丁之電激發化學發光偵測系統，尼古丁扮演的便是三級胺的角色，主要的反應機制是尼古丁之氮分子上電子具有不錯的還原力，會將電子供給放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  氧化後的產物  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，本身形成帶正電自由基的中間產物，在偏鹼性溶液中脫去帶正電荷之氫離子，並轉換成高度活性的不帶電自由基，此中間產物再將能量轉移至  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，進而生成激發態  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2*}$  而放出波長為 620 nm 的螢光。整個反應過程中有兩個部分會與溶液酸鹼值密切相關，其一是三級胺之氮分子須保有身上的未共用電子對活性，其二則是帶正電荷自由基之中間產物，須在利於它離去氫離子的溶液環境，以助其進一步參與放光反應的進行。由上述可知本偵測系統的有利環境應是鹼性溶液，而由實驗的結果看來 圖(38)，相當符合上述之機理，即鹼性溶液中較有利於本系統放光反應的發生；此酸鹼度的探討選擇了 0.1 M, pH 值分別為 4、6、7、8、9、10 的磷酸緩衝溶液，結果顯示螢光訊號值隨溶液中的氫離子濃度減少，而光電流訊號顯著上升，並在 pH 8 後光訊號值趨於平緩，而尼古丁本身的  $\text{pK}_{\text{b1}}$  與  $\text{pK}_{\text{b2}}$  分別為 6.16 和 10.96，所以在 pH 8 之溶液環境，三級胺上之氮分子以絕對大量未共用電子對的形式存在，也有利於電生成螢光之反應，而緩衝溶液在較鹼的狀態，由結果得知對電激發化學發光反應之螢光訊號並無太大的影響，所以實驗最後選擇訊號靈敏度佳且較中性之磷酸緩衝溶液 pH 8 為最適化條件，並以此酸鹼度之緩衝溶液做接續的實驗條件探討。

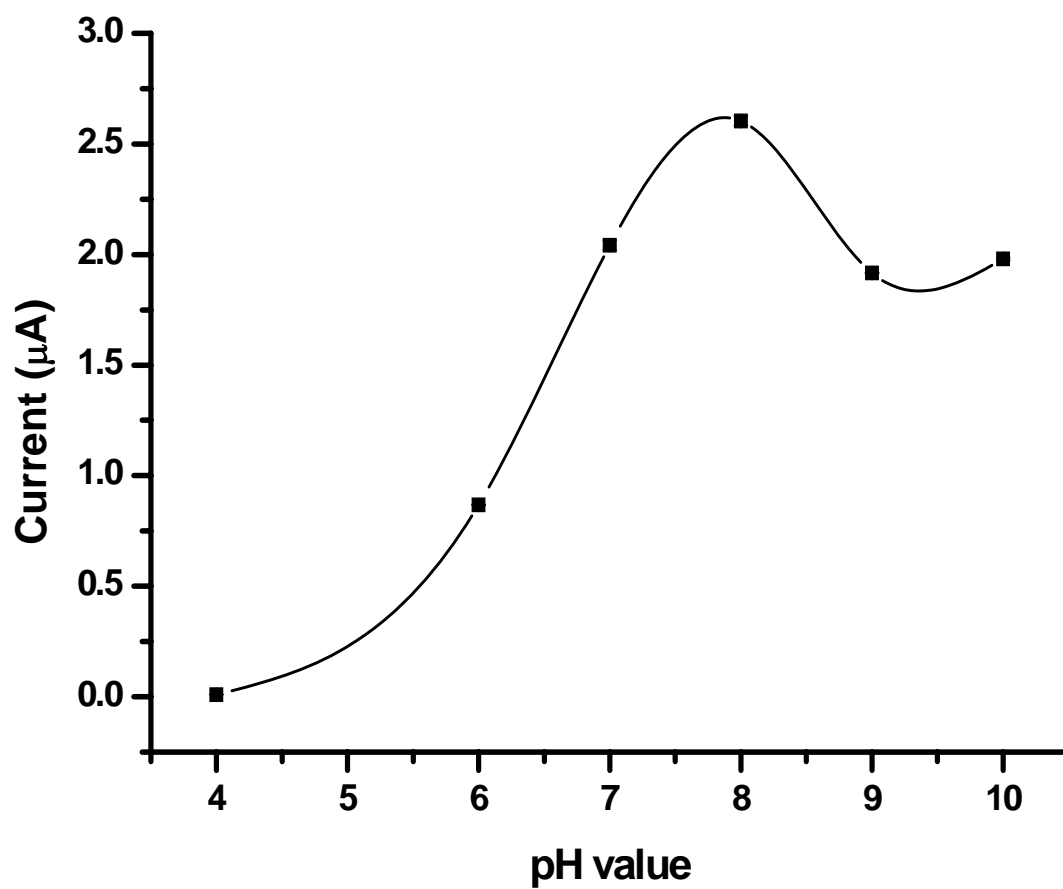


圖 (38) 緩衝溶液之酸鹼值的探討。圖為尼古丁偵測系統中緩衝溶液之酸鹼值改變對光電流訊號的影響，酸鹼值的探討在 pH 4 ~ 10 間，載流液體流速為 1.0 mL/min，而其他的操作條件則如同圖 (37) 所示。

## 緩衝溶液種類之影響

緩衝溶液之酸鹼度確定後，實驗考慮的是緩衝溶液中不同電解質可能帶來的效應，因為在電激發化學發光反應的系統，電解質所扮演的角色不只在讓溶液中離子或電子可順利的移動，它還可能輔助或競爭反應物氧化還原的進行，或造成電螢光的增加或驟熄 (quench)，因此探究各種電解質以選擇適當的緩衝溶液種類是必要的。在此，實驗選擇了酸鹼值在 pH 8 具有良好緩衝能力的不同種類電解質做研究，使用了 Tris、phosphate、Boric acid、Carbonate 等四種緩衝溶液來進行最佳化的探討，於圖 (39) 中可明顯的觀察到使用磷酸緩衝溶液所得的光電流訊號最大，推測可能的原因是磷酸與硼酸和碳酸 (carbonate) 比較，其相對活性較差，較不會與反應中間物自由基作用而減小電螢光的產生，而 Tris 緩衝溶液則可能是氮原子上的未共用電子對參與了反應，取代了尼古丁提供電子生成自由基的角色，因而使電螢光訊號驟減，綜合上述論點，實驗最後選擇對系統具最佳穩定性及靈敏度的磷酸緩衝溶液為最佳操作條件。

## 緩衝溶液濃度之探討

緩衝溶液的探討，在研究過酸鹼值及種類的影響後，還需探討的是緩衝溶液中電解質的濃度，因為電激發化學發光中牽涉到電化學反應，而電化學反應的進行，就少不了在溶液中的電解質，以幫助溶液中反應物質行氧化還原時，電子與離子間電流的傳遞，此外電解質濃度的改變也會產生不同的離子強度及活性，而影響偵測時的靈敏度。本實驗對不同濃度的磷酸緩衝溶液做探討，分別為 0.01、0.025、0.05、0.10 及 0.15 M 共五種濃度，在圖 (40) 之結果觀察發現濃度低於 0.1 M 時，訊號靈敏度明顯變小，而在濃度為 0.05 M 後，電螢光訊號趨於平緩，原因可能是電解質濃度變低時，溶液中的離子導電性不佳，使電子傳遞效果變差，而使光電流訊號急劇減小；而且緩衝溶液的濃度不足時，將造成對酸鹼值緩衝能力的衰減，在實際偵測環境樣品時將嚴重影響分析的準確性，因此最後選擇溶液較具緩衝能力，且訊號靈敏度佳的 0.1 M 磷酸緩衝溶液作為最佳之操作環境。

## 螢光物質 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度之探討

在電激發化學發光反應中，發光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  角色的重要性不言而喻， $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  若能源源不斷的提供而進行氧化，則有助於大量生成  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ，進而與尼古丁作用，產生  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$  之激發態物質而放出螢光，因此電螢光訊號強度將與  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的濃度成絕對關係，故實驗中探討了五種不同的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  濃度，分別是 0.1、0.2、0.3、0.4 及 0.5 mM 時對尼古丁偵測的影響。結果如圖 (41) 所示，與預期之結果相符合，當  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  濃度增加時，電螢光訊號也成線性增加，但由於本實驗階段之放光物質是混合在載流液體中，隨著偵測時間的消逝，反應物  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  隨之在消耗，而由圖 (41) 也可觀察到系統在放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  濃度為 0.1 mM 時操作，偵測 50  $\mu\text{M}$  濃度之尼古丁，其電螢光訊號已達約 2800 nA，已有相當好的偵測靈敏度，偵測極限濃度可達 1.25 nM，此結果已足以應用於人體體液或環境污染的分析，因

此為避免反應試劑隨載流液體流失過度而造成不必要的浪費，本系統最後選擇濃度為 0.1 mM 之  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  為最佳化條件。

#### 樣品注射體積之探討

本電激發化學發光系統搭配了自動化的流注分析裝置，樣品的注入是藉由自動注射閥來達成，而樣品注射體積的控制，則是利用不同大小的樣品迴路 (sample loop) 來決定，而樣品注入的體積將影響電螢光之靈敏度，若注入的樣品體積太少，樣品經由載流液體運送時，因擴散作用造成樣品在管路中被稀釋，而使電螢光訊號峰的下降，而若注入的體積過多，又會造成分析樣品的浪費。因此須選擇一個適當的樣品體積來分析，實驗中選擇四種樣品體積來注射，分別是 10、20、50 和 100  $\mu\text{L}$  之容量，而分析結果如圖 (42)，樣品體積為 50  $\mu\text{L}$  時有較大的光訊號，但實驗中觀察得知，樣品體積增加至 50  $\mu\text{L}$  或是大於此體積時，訊號峰會分裂成兩個，使偵測單次的分析時間相對增長，相當不利於開發快速偵測系統的需求，而其生成兩個訊號峰的原因，可能是當樣品體積過大，使得樣品通過電極面反應時，中間區域之尼古丁樣品，周圍只含有限經擴散而來的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  可與之作用，而顯著的減小電激發化學發光效率，而隨後流至電極面的尼古丁卻又能充分與管路中的  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  反應，而接續產生較佳的電螢光訊號，因此可見到兩個訊號峰，如圖 (43)。而當樣品體積低於 50  $\mu\text{L}$  時，光訊號漸漸變小，應是尼古丁的濃度在管路中傳送時，因擴散而被稀釋了。綜合上述的結論，為了避免大的樣品體積造成解析度變差或浪費樣品，以及因樣品體積太少而影響訊號靈敏度，最後選擇樣品注射體積為 20  $\mu\text{L}$  為最佳化條件。

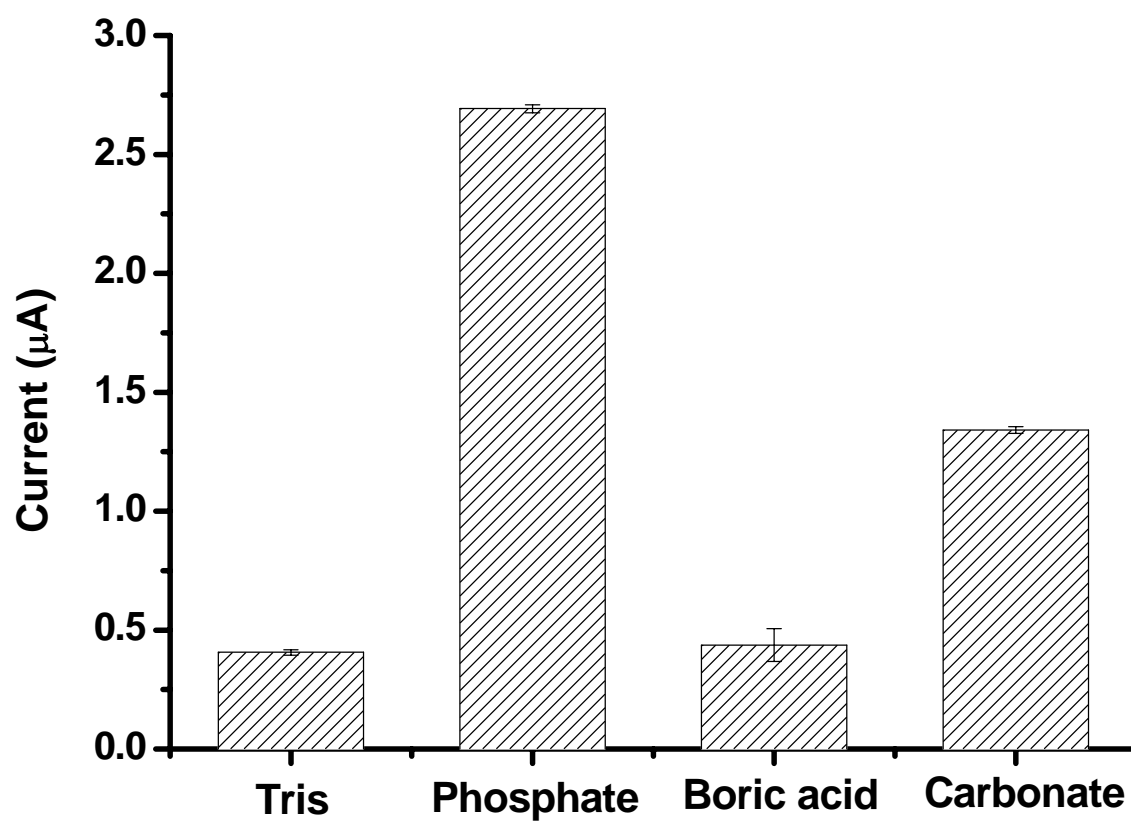


圖 (39) 緩衝溶液電解質種類的探討。圖中顯示尼古丁偵測系統在 Tris 、 Phosphate 、 Boric acid 、 Carbonate 等四種不同電解質緩衝溶液操作時，對產生光電流訊號的影響，溶液酸鹼值為 pH 8 ，而其他的操作條件則如同圖 (38) 所示。

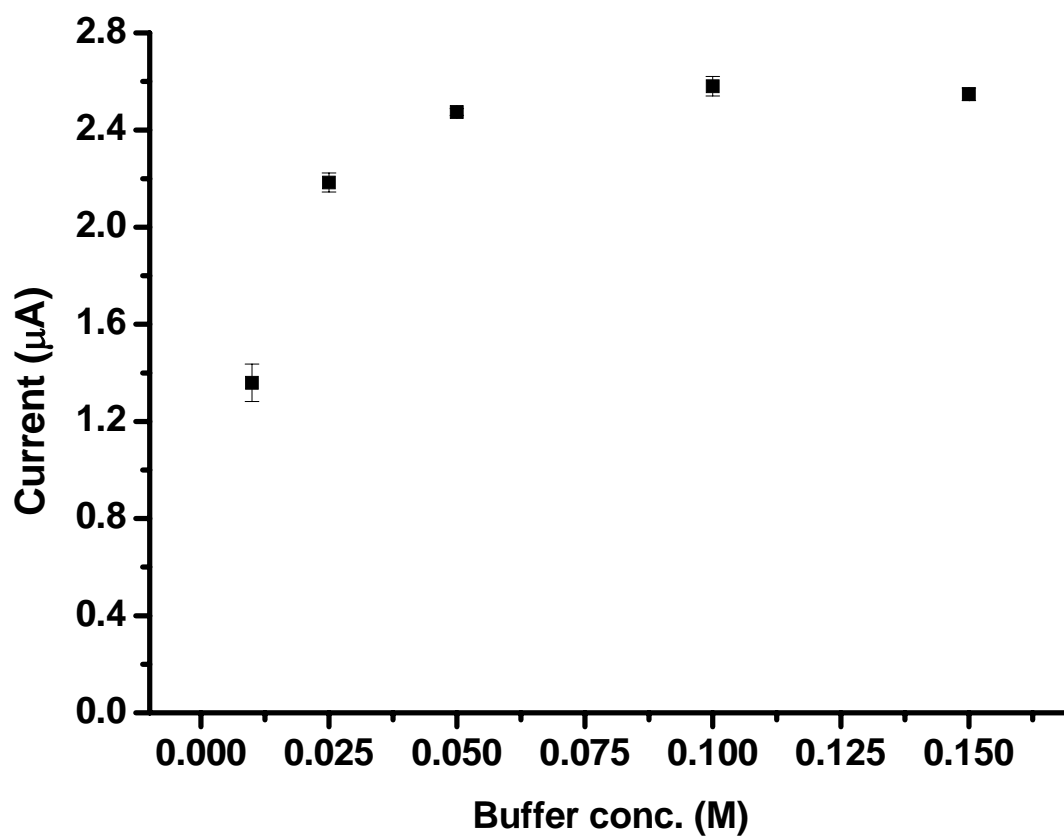


圖 (40) 磷酸緩衝溶液濃度的探討。圖中顯示尼古丁偵測系統之磷酸緩衝溶液濃度改變對光電流訊號的影響，磷酸溶液濃度研究範圍在 0.01 ~ 0.15 M 間，而其他的操作條件則如同圖 (39) 所示。

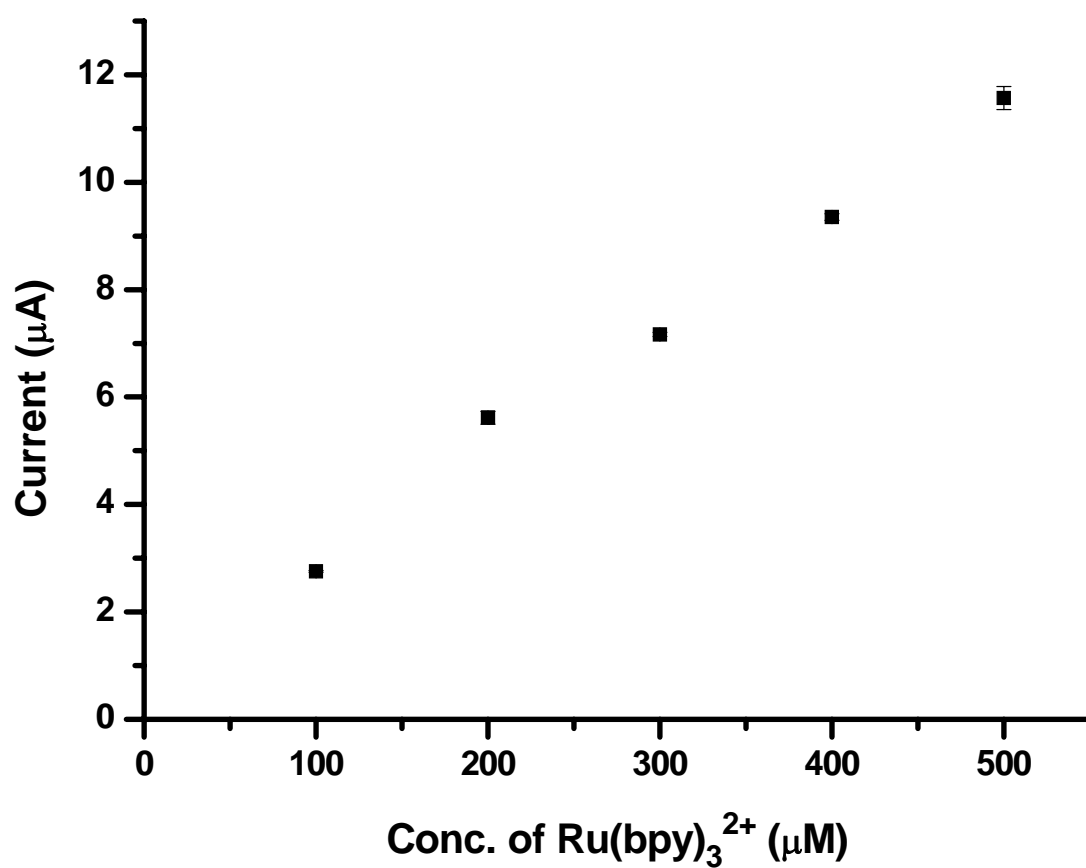


圖 (41) 發光物質  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$  濃度的探討。圖中顯示尼古丁偵測系統之磷酸緩衝溶液濃度改變對光電流訊號的影響，磷酸溶液濃度研究範圍在 0.01 ~ 0.15 M 間，而其他的操作條件則如同圖 (39) 所示。



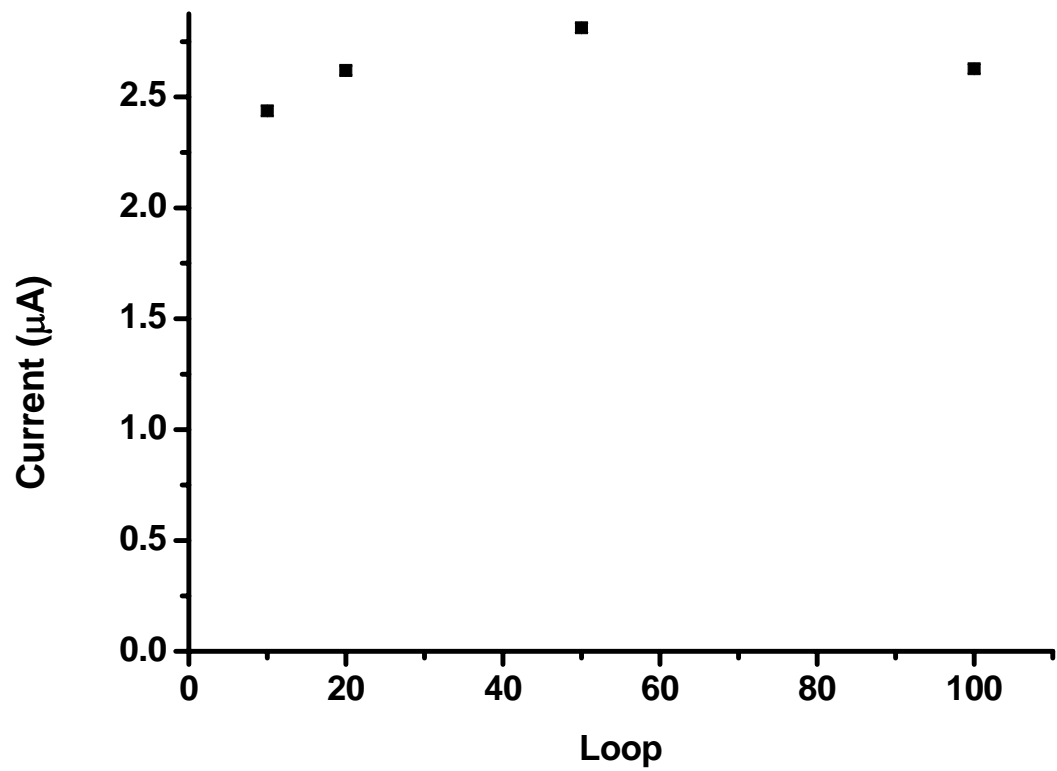


圖 (42) 樣品迴路體積的探討。圖中顯示尼古丁偵測系統之樣品迴路體積改變對光電流訊號的影響，樣品體積分別為 10 、 20 、 50 和 100  $\mu\text{L}$  ，磷酸緩衝溶液的濃度為 0.1 M ，而其他的操作條件則如同圖 (41) 所示。

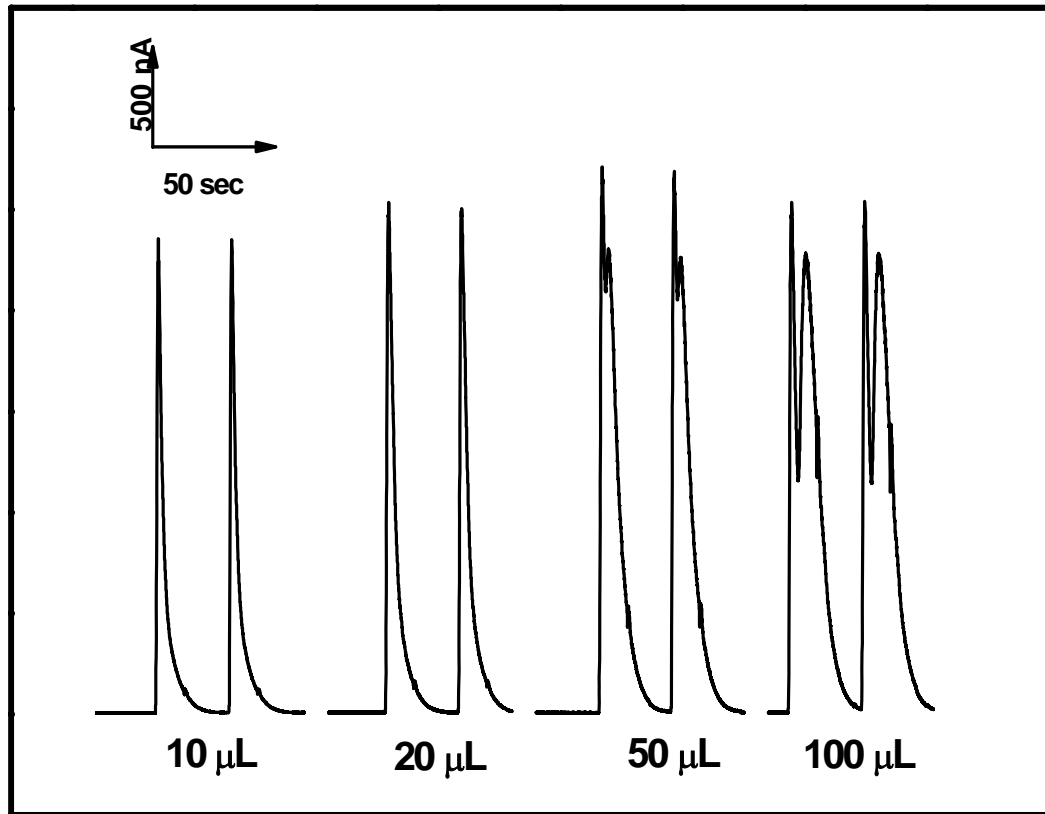


圖 (43) 樣品迴路體積探討的真實訊號圖，其操作條件如圖 (42) 所述。

至此已探討完尼古丁電激發化學發光系統的各项操作參數，包括：氧化操作電位、載流液體流速、溶液酸鹼值、緩衝溶液種類、緩衝溶液濃度、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度以及樣品注入體積等，其最佳化結果整理如表 (7) 所示，並在系統之最佳化條件下，研究本偵測裝置的各项分析特性，如系統之分析工作曲線、偵測極限和干擾物的影響等等，將於下節中繼續做進一步探究。

表 (7) 尼古丁分析系統之最佳化操作條件

最適化參數	最佳化結果
氧化操作電位	1.4 V ( vs. Ag/AgCl )
載流液體流速	1.0 mL/min
溶液酸鹼值	pH 8
緩衝溶液種類	phosphate
緩衝溶液濃度	0.1 M
$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 濃度	0.1 mM
樣品注入體積	20 $\mu\text{L}$

## 分析特性的探討

本研究已針對可能影響尼古丁偵測系統的操作參數，最詳盡的探討，並決定了本系統偵測尼古丁時之最佳操作狀態，在最適化條件：氧化操作電位 1.4 V、0.1 M, pH 8 之磷酸緩衝溶液內含 0.1 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 、流速 1 mL/min 與樣品體積為 20  $\mu\text{L}$  下，探討此系統的分析特性，預得知的結果包含分析工作曲線、系統偵測靈敏度、分析再現性、偵測極限、干擾物以及真實樣品的評估等。

尼古丁電激發化學發光偵測系統，在氧化電位 1.4 V、0.1 M, pH 8 之磷酸緩衝溶液內含 0.1 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 、流速 1 mL/min 與樣品體積為 20  $\mu\text{L}$  的最適化操作條件下，所獲得的尼古丁濃度分析之工作曲線如圖 (44)，偵測濃度範圍是 10 nM ~ 500  $\mu\text{M}$ ，每個濃度分別偵測四次，結果顯示尼古丁線性濃度到達 100  $\mu\text{M}$  時，相關係數為 0.9976，並可求得此偵測系統的靈敏度為 106.17  $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$ ；進一步的實驗得知在連續 20 次測量 50  $\mu\text{M}$  尼古丁時，可獲得很好的操作再現性，相對標準偏差為 1.439%，而系統的最低偵測濃度可達 1.25 nM (S/N=3)，為非常靈敏的尼古丁分析方法如表 (8)，可知此尼古丁偵測系統具相當不錯分析特性。

## 干擾物的測定

由於環境中有許多干擾的存在，為了評估尼古丁農藥感測器在環境可避免的干擾，本實驗分別對 SDS、樟腦 (camphor) 及腐植酸 (humic acid) 做干擾物評估。因 SDS 為介面活性劑，常被用來幫助農藥的溶解，且因 SDS 為典型的兩性離子物質，所以將 SDS 可作為評估環境中帶電離子可能造成的電極吸附影響。樟腦由於分子較大易影響電極表面的質傳行為，進而影響偵測的訊號，故評估此化合物用以代表大分子物質對電化學反應的影響。而腐植酸是環境中常見的易氧化物質，常在低氧化電位下便造成偵測系統的電流訊號干擾，以它的氧化干擾行為可充分表達，已開發出系統的分析選擇性。偵測裝置在上述代表干擾物存在下，於操作電位為 1.4 V (vs. Ag/AgCl)，以 0.1 M, pH 8 磷酸緩衝溶液，內含 0.5 mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  放光物質作為載流之液體，在流速為 1.0 mL/min，樣品迴路體積是 20  $\mu\text{L}$  的最佳化條件下，分別偵測 2 ppm 的尼古丁樣品，其中個別含有 2 ppm SDS、camphor 及 humic acid，所得結果分別與標準 2 ppm 尼古丁的訊號做比較，其誤差比例相當小，為 0%、0.72% 和 5.8%。此外，顯示此分析尼古丁農藥的電激發化學發光系統具有良好的樣品偵測選擇性。

### 回收率 (Recovery) 的探討

本實驗為了應用於水樣品的偵測，在操作電位為 1.4 V (vs. Ag/AgCl) ，含有濃度 0.1mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的 0.1 M , pH 8 磷酸緩衝溶液，流速為 1.0 mL/min ，樣品迴路體積是 20  $\mu\text{L}$  的最佳化條件下測定二種來源不同水樣品中加入 2 ppm 尼古丁的回收率 (recovery) ，測得的回收率分別是田間水為 94% 、池塘水為 102.3% 。此外應用於人體體內尼古丁樣品的偵測，而人體之尿液中有許多物質，可能會對系統造成干擾例如：蛋白質、胺基酸等，所以利用前處理處理樣品使干擾降低，步驟為在尿液中先加入兩滴的氨水 25 mL 的二氯甲烷，萃取後，取有機層，再加入 4 mL , 0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  萃取後取水層，樣品利用磷酸及 NaOH 調整到 pH 8 後，即完成前處理步驟。之後上述樣品配製成 5  $\mu\text{M}$  尼古丁，在電位為 1.4V (vs. Ag/AgCl) ，於含有 0.1mM  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的 0.1M , pH 8 磷酸緩衝溶液，樣品體積為 20  $\mu\text{L}$  及流體速度為 1 mL/min 之最佳條件下，其回收率為 103.6% 。

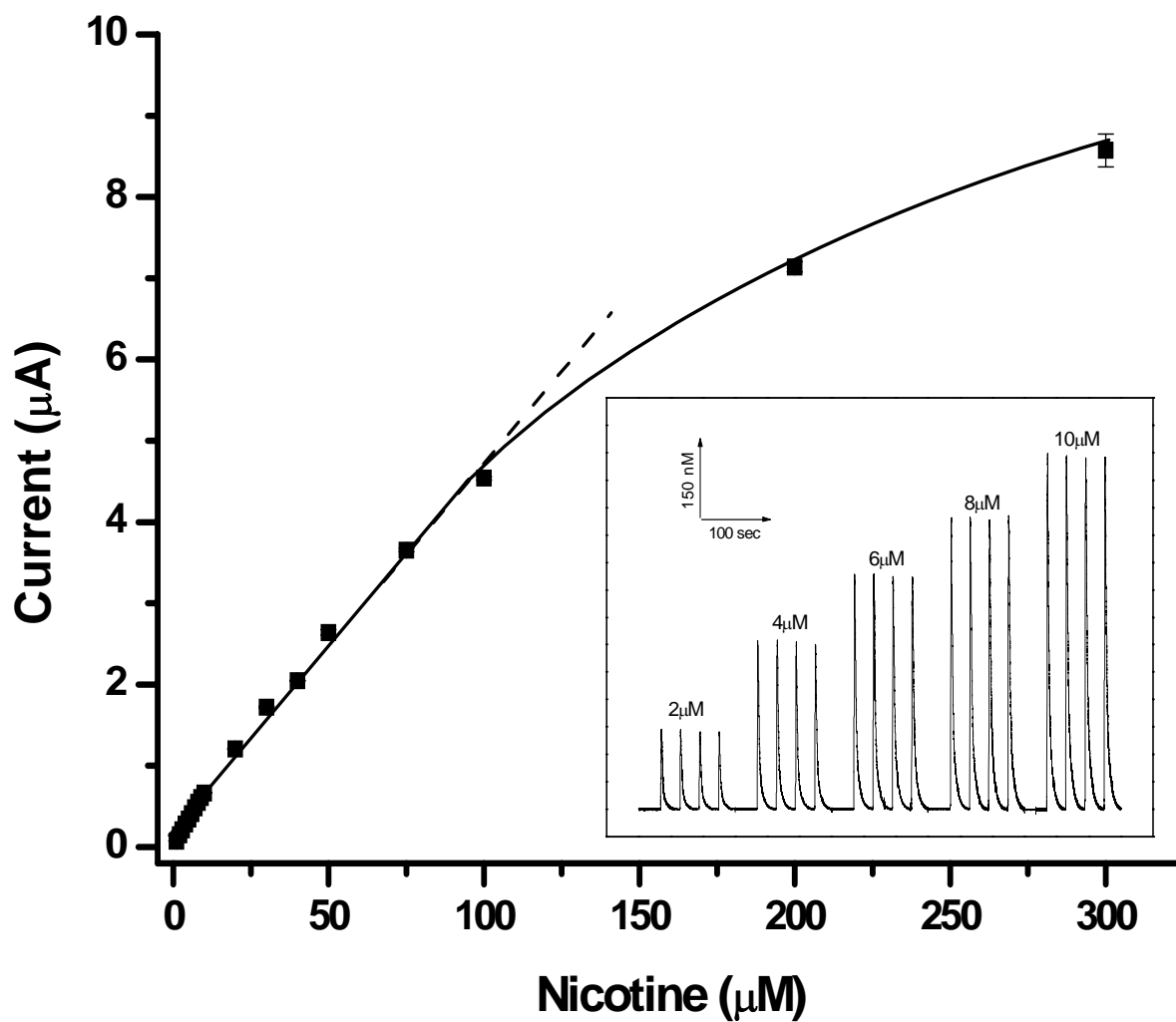


圖 (44) 尼古丁之電激發化學發光系統的濃度校正曲線。在 ITO 電極上施加 1.4 V，於含有 0.1 mM,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  的 0.1 M, pH 8 磷酸緩衝溶液，樣品體積為 20  $\mu\text{L}$  及流體速度為 1.0 mL/min 之條件下偵測尼古丁，其濃度範圍在 2 ~ 300  $\mu\text{M}$  間所得的濃度校正曲線圖。

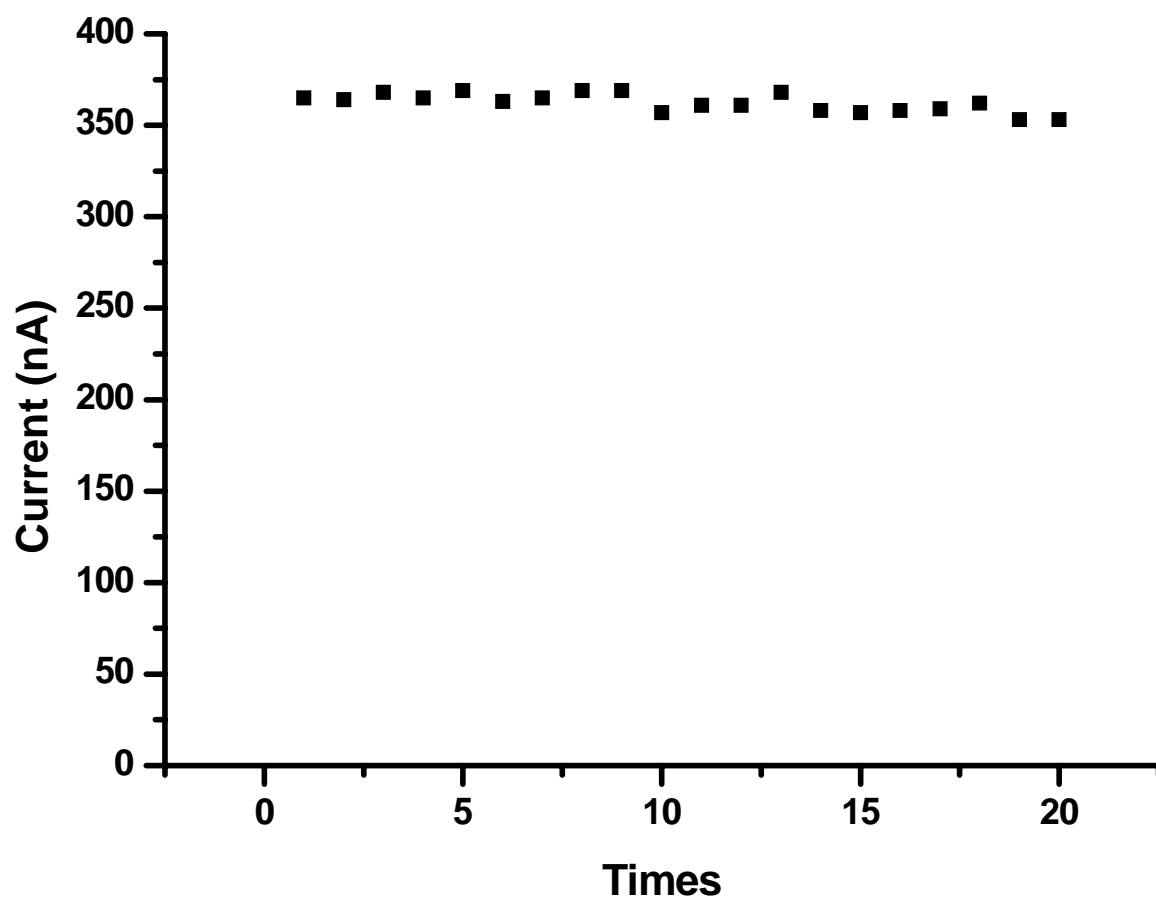


圖 (45) 尼古丁偵測系統之再現性的探討。在最佳化條件（見圖 43）下連續偵測 20 次  $5\text{ }\mu\text{M}$  之尼古丁，所得的訊號響應圖。

表 (8) 尼古丁偵測系統之分析特性

分析特性	結果
線性範圍	100 $\mu\text{M}$ ( $r=0.9976$ )
偵測靈敏度	106.17 $\text{mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$
偵測極限	1.25 $\text{nM}$ ( $S/N=3$ )
相對標準偏差	1.439%
干擾物	SDS : nd
	Camphor : 0.76%
	Humic acid : 5.8%
真實樣品	Farm : 94%
	Campus : 102.3%



## 結論

本實驗已成功發展一套利用電化學放光，應用在尼古丁農藥之偵測系統，本系統具有以下優點，快速偵測、高靈敏度、低干擾物及極低的偵測極限 (1.25 nM)。同時本系統具有高穩定性，在最佳化條件下連續偵測 20 次 50  $\mu$ M 尼古丁，準確度 (RSD) 達到 1.439%。而在偵測農藥上由於電化學放光系統的特性，專一性高，可避免偵測尼古丁農藥殘留時，干擾物的干擾。由於尼古丁在人體內代謝後，在尿液中存在的尼古丁偵測時會受許多人體蛋白質或是許多雜質所影響，而造成極大的干擾，本實驗利用二氯甲烷萃取後，添加 5  $\mu$ M 的尼古丁作測量，發現回收率為 103.6%，期盼在不久的將來，本系統結合其他分離系統如微流道，去分離雜質以達到簡易的檢測方法。可測量環境中農藥尼古丁殘留，也可測量人體內尼古丁的含量。

## 計畫成果自評

本研究已成功開發出農藥生化感測器及各式樣之電化學農藥分析與電激發化學發光的偵測系統，研究過程結合了多樣的電化學相關技術包括：生化感測器、電化學反應及偵測系統、厚膜印刷技術、自動流注分析系統、脈衝再生自動化和電激發化學發光系統等等，目的在解決過去以電化學方式偵測時，常遭遇待測農藥不具電活性或直接偵測造成電極表面毒化的問題，針對這些問題研究中提供了許多的改善之道，以含氮類、醯胺類及酚類等等農藥作為分析對象，說明了本研究如何有效的解決上述問題，並成功的發展出除草寧、2,4,6-三氯酚、乙烯硫脲、尼古丁和達諾殺等農藥檢測系統，祈使光暨電化學技術在農藥的分析上更趨完善。

本研究首先希望利用酵素辨識系統來發展農藥生化感測器，研究是利用醯胺類專一性分解酵素 (Aryl acylamidase, EC 3.5.1.13)，可選擇性辨識除草寧除草劑的特性，並可將其分解成具電活性的苯胺類物質，再結合實驗室的厚膜印刷技術，開發拋棄式印刷電極來對除草寧農藥進行定量分析，完成電化學方式發展農藥生化感測器的目標。此成功發展出除草寧農藥生化感測器，具有長的分析線性，在  $20 \sim 400 \mu\text{M}$  間的相關係數還高達  $0.9990$  ( $n=8$ )，明顯的改善了過去抑制型農藥生化感測器發展時所遇到的瓶頸，且由於它的可攜性及酵素反應時間只需 60 秒，有效達到農藥檢測需快速且及時的目標，這些優點將讓本研究開發之除草寧農藥生化感測器有更多的應用價值。

在發展農藥生化感測器後，緊接著研究也希望能藉由化學反應的方式，來解決電化學系統偵測易氧化物質卻造成毒化電極的問題。研究是利用化學反應前處理的方式開發農藥分析系統，先以硝酸鉀之強氧化試劑與待分析農藥 2,4,6-三氯酚作用，生成可逆的易還原 2,6-二氯苯醌化合物，並施加  $-50 \text{ mV}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) 的低電壓進行還原偵測，而定量 2,4,6-三氯酚之農藥，可同時解決電極毒化和干擾的問題。此 2,4,6-三氯酚農藥化學分析系統的研究結果顯示了多項優點，包括其偵測濃度線性範圍長，在  $0.4 \sim 750 \mu\text{M}$  間且其線性相關係數更高達  $0.9999$ ，且具有不錯的操作再現性，相對標準偏差為  $4.03\%$  ( $n=20$ )，而偵測極限濃度可低至  $40 \text{ nM}$  ( $S/N=3$ )，且環境水樣中常見的干擾物影響程度不大：腐質酸 ( $-9.79\%$ )、SDS ( $-2.99\%$ ) 及 Camphor ( $0.98\%$ )，而分析實際農田及校園池塘水樣時，有不錯的回收率，分別為  $105.2\%$  及  $107.5\%$ ，由上述結果可知本系統可直接應用於環境水樣的分析。當然此農藥電化學分析系統的應用，不會只限於會毒化電極的物種分析，當然也可應用於非活性待測物的分析，只需針對欲分析物選擇適合的反應試劑，將其反應成電活化性物質，即可利用此系統進行量測，提供各種農藥化學分析系統開發時，多一個可考慮應用的偵測方式。

接下來是利用自動化技術發展一套方便且可連續式處理電極毒化現象的系統，即文中介紹的自動化脈衝電壓電極再生的系統，研究整合 LabVIEW 圖控程式、自動注射閥、自組定電位儀及流動注射系統等，其偵測方法主要是系統在偵測完乙烯硫脲後立即施加脈衝電壓使電極表面再生，電極再生程序完後即可進行下一次乙烯硫脲的偵測，成功的應用於易毒化電極表面物質乙烯硫脲農藥的偵測，使其操作再現性獲得顯著的改善。利用此自動偵測系統也改善了過去施加脈衝再生電壓於毒化的電極時，需要將電極拆卸下來，在以波形產生器施加脈衝電壓來再生電極的麻煩，不但節省了時間、人力，避免電極在拆卸過程中受到外界

污染，也達到重複再現性分析易毒化電極物質的要求，未來可配合網路建構起遠端遙控偵測系統，達到即時監控的功能。

針對非電活性物質的農藥分析系統，如烷基胺類的偵測，其本身在電化學容許之電位施加區間，並無電流訊號的產生，在此研究考慮以電激發化學發光方式來開發此類相關農藥的偵測，選擇在溶液環境中穩定性佳的放光物質  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ，利用它和三級胺類等共反應試劑結合可產生光訊號的模式，來發展本身不具電活性之尼古丁的農藥分析系統。系統在尼古丁農藥偵測中展現了極低之偵測極限濃度 (1.25 nM, S/N=3)，同時具有高度的穩定性，在最佳化條件下連續操作 20 次之分析再現性為 1.439%，且在干擾物及實際水樣的評估也都實現了低干擾及高回收率的目標，研究成果展現了此電激發化學發光農藥檢測系統，具有高的分析靈敏度、穩定的操作再現性及好的選擇性等分析特性，很適合進一步發展成可及時監控環境水樣之農藥殘留的工具。

綜合上述，本研究旨在努力拓展過去利用電化學分析農藥上所遭遇的瓶頸，合理的提出各種解決的策略，由偵測技術的改變、分析物的化學反應前處理以衍生化，乃至利用自動化系統等方式來進行，多樣式的手段已成功達到農藥分析系統，簡便、快速、好的選擇性、高靈敏度及高再現性的多項要求，而此研究理念與系統可進一步應用於臨床、藥物及其他環境污染的分析，未來更可將其發展成並可將可攜式之分析儀器，以達到就地或居家檢測的最終目標。

本三年計畫多項預期目標已於今年開花結果(見附錄)，如：附錄(一)鐵氧化物催化電極相關文獻(期刊，Electroanalysis)、附錄(二)殺菌劑農藥相關之乙烯硫尿自動化分析(期刊，JCCS)、附錄(三)鈉乃浦化學感測器(期刊，Electroanalysis)、拋棄式除草寧農藥生化感測器(93 年 5 月之西班牙國際會議)、賽滅淨殺蟲劑農藥之分析(92 年度碩士畢業論文，繆佳紋)、電激發化學發光暨電化學偵測系統於農藥上的分析(93 年度博士畢業論文，王俊勝)以及金屬氧化物修飾電極發展環境及生醫感測器等等(93 年度博士畢業論文，呂晃志)；所累積的開發經驗相當豐富，總結本三年計畫執行完畢的成果報告相當的豐碩。

## 參考文獻

- <sup>1</sup> M. K. Hill, *Understanding Environmental Pollution*, Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- <sup>2</sup> G. W. Ware, *The Pesticide Book*, Thomson Publisher, CA, 1989.
- <sup>3</sup> F. C. Lu, *Basic Toxicology*, Yi Hsien Publishing Co. Ltd., Taipei, 1998.
- <sup>4</sup> M. A. Kamrin, *Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate*, Lewis Publisher, New York, 1997.
- <sup>5</sup> C. Tixer, M. Sancelme, F. Bonnemoy, A. Cuer, H. Veschambre, Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation, *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 (2001) 1381-1389.
- <sup>6</sup> Y. Ozeki, A. Komamine, Y. Tanaka, Induction and repression of phenyl- alanine ammonia-lyase and chalcone synthase enzyme proteins and mRNAs in carrot cell suspension cultures regulated by 2,4-D, *Physiol. Plant.*, 78 (1990) 400-408.
- <sup>7</sup> B. Riggle, Development of a preliminary enzyme-linked immunosorbent assay for the herbicide trifluralin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46 (1991) 404-409.
- <sup>8</sup> R. J. Hance, K. Holly, *Weed Control Handbook: Principles*, 8th ed., Blackwell, Oxford, U.K., 1990.
- <sup>9</sup> K. H. Buchel, *Chemistry of Pesticides*, Wiley, New York, 1997.
- <sup>10</sup> J. H. Stender, *Occupational Safety and Health Standards*, vol. 39, Federal Register, 1974, p. 3756.
- <sup>11</sup> G. W. Ivens, *The UK Pesticide Guide*, British Crop Protection Council, Cambridge, 1992, p. 18.
- <sup>12</sup> R. E. Gosselin, R. P. Smith, H. C. Hodge, *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 5th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1984, p. 11.
- <sup>13</sup> T. S. Scott, *Carcinogenic and Toxic Hazards of Aromatic Amines*, Elsevier, New York, 1962.
- <sup>14</sup> A. Balinova, Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water, *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 203-207.
- <sup>15</sup> M. C. Gennaro, C. Abrigo, D. Giacosa, L. Rigotti, A. Liberatori, Separation of phenylurea pesticides by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography diuron determination in lagoon water, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 81-88.
- <sup>16</sup> J. A. Field, R. L. Reed, T. E. Sawyer, M. Martinez, Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial lution, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3897-3902.
- <sup>17</sup> B. L. Worobey, Simplified heptafluorobutyrylation of linuron and its meta- bolite 3,4-dichloroaniline, *J. Chromatogr. A* 262 (1983) 328-330.
- <sup>18</sup> J. Fischer, P. Jandera, Chromatographic behaviour of phenylurea pesticides in high-performance liquid chromatography with nitrile- and amino-bonded stationary phases, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 77-92.
- <sup>19</sup> S. M. Walters, B. C. Westerby, D. M. Gilvydis, Determination of phenylurea pesticides by high-performance liquid chromatography with UV and photoconductivity detectors in series, *J. Chromatogr. A* 317 (1984) 533-544.
- <sup>20</sup> M. C. Gennaro, C. Abrigo, D. Giacosa, L. Rigotti, A. Liberatori, Separation of phenylurea pesticides by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography diuron determination in lagoon water, *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 81-88.
- <sup>21</sup> R. G. Luchtefeld, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59 (1987) 740

- 
- <sup>22</sup> W. M. Draper, S. R. Ruberu, S. K. Perera, Multiresidue HPLC methods for phenyl-urea herbicides in water, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4109-4115.
- <sup>23</sup> A. M. O. Brett, C. M. Delerue-Matos, E. M. Garrido, J. L. C. Lima, Electrochemical oxidation of bentazon at a glassy carbon electrode Application to the determination of a commercial herbicide, *Talanta* 46 (1998) 1131-1135.
- <sup>24</sup> A. D. Corcia, A. Costantino, C. Crescenzi, R. Samperi, Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters, *J. Chromatogr. A* 852 (1999) 465-474.
- <sup>25</sup> K. Levsen, K. H. Schafer, Determination of phenylureas by on-line liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 271 (1983) 51-60.
- <sup>26</sup> U. A. Th. Brinkman, A. D. Kok, R. B. Geerdink, Determination of phenylurea herbicides via direct derivatisation with heptafluorobutyric anhydride, *J. Chromatogr. A* 283 (1984) 113-126.
- <sup>27</sup> W. M. Draper, Electrospray liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry determination of phenyl urea herbicides in water, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2746-2755.
- <sup>28</sup> S. T. Joselito, P. Quirino, N. Inoue, Reversed migration micellar electrokinetic chromatography with off-line and on-line concentration analysis of phenylurea herbicides, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 187-194.
- <sup>29</sup> W. F. M. Stöcklein, M. Rohde, G. Scharte, Olaf Behrsing, A. Warsinke, B. Micheel, F. W. Scheller, Sensitive detection of triazine and phenylurea pesticides in pure organic solvent by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): stabilities, solubilities and sensitivities, *Anal. Chim. Acta.* 405 (2000) 255-265.
- <sup>30</sup> C. Paolo, D. Paolo, M. Marco, Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pesticides VII. Analysis of Vinclozolin, Iprodione, Procymidone, Dichlozolate and their degradation product 3,5-dichloroaniline on white must and wine extracts, *J. Chromatogr. A* 256 (1983) 176-181.
- <sup>31</sup> A. Collinge, A. Noifalise, Determination of thiabendazole residues in marmalades by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 257 (1983) 416-418.
- <sup>32</sup> B. C. Verma, R. K. Sood, H. S. Sidhu, A new colorimetric method for the determination of carbon disulphide and its application to the analysis of some dithiocarbamate fungicides, *Talanta* 30 (1983) 787-788.
- <sup>33</sup> V. K. Gupta, V. Agrawal, P. Shivhare, Spectrophotometric determination of Zineb (a dithiocarbamate fungicide) by the methylene blue method, *Fresenius J. Anal. Chem.* 344 (1992) 350-352.
- <sup>34</sup> V. K. Gupta, R. Kesari, A sensitive spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamate fungicide and its application in environmental samples, *Talanta* 45 (1998) 1097-1102.
- <sup>35</sup> T. P. Rao, L. Mathew, C. S. P. Iyer, A. D. Damodaran, Spectrophotometric determination of ziram (dithiocarbamate fungicide) by thiocyanate and rhodamine 6G method, *Talanta* 42 (1995) 41-43.
- <sup>36</sup> A. L. J. Rao, A. K. Malik, Spectrophotometric determination of iron(III) dimethyldithiocarbamate (ferbam), *Talanta* 44 (1997) 177-183.
- <sup>37</sup> K. H. Gustafsson, R. A. Thompson, High-pressure liquid chromatographic determination of fungicidal dithiocarbamates, *J. Agric. Food Chem.* 29 (1981) 729-732.
- <sup>38</sup> D. L. Sedlak, K. W. Weissmahr, C. L. Houghton, Analysis of the dithiocarbamate fungicides ziram, maneb, and zineb and the flotation agent ethylxanthogenate by ion-pair reversed-phase HPLC, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4800-4804.

- 
- <sup>39</sup> C. -C. Lo, M. -H. Ho, M. -D. Hung, Use of high-performance liquid chromatographic and atomic absorption methods to distinguish propineb, zineb, maneb, and mancozeb fungicides, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2720-2723.
- <sup>40</sup> I. H. Pomerantz, L. J. Miller, G. Kava, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53 (1970) 154.
- <sup>41</sup> P. B. Baker, B. Flaherty, Fungicide residues. Part II. The simultaneous determination of residues of folpet, captan and captafol in selected fruits by gas chromatography, *Analyst* 97 (1972) 713-718.
- <sup>42</sup> W. Schwack, B. Bruger, S. Nyanzi, Simultaneous differential pulse-polarographic determination of CS<sub>2</sub> and COS gases and its application in the analysis of dithiocarbamate fungicide residues in foods, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 297-300.
- <sup>43</sup> W. H. Chan, A. W. M. Lee, S. L. Ng, W. L. Liu, Differential-pulse polarographic micro-determination of amines via in situ generation of dithiocarbamates, *Analyst* 117 (1992) 1909-1912.
- <sup>44</sup> E. S. Rocha, M. D. Santos, E. X. Albuquerque, Low concentrations of the organophosphate VX affect spontaneous and evoked transmitter release from hippocampal neurons: toxicological relevance of cholinesterase- independent actions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159 (1999) 31-40.
- <sup>45</sup> C. Rohl, M. Gulden, H. Seibert, Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes, *Cell Biol. Toxicol.* 17 (2001) 23-32.
- <sup>46</sup> C. D. Rubin, C. Y. C. Pak, B. Adams-Huet, H. K. Genant, J. Li, D. S. Rao, Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis, *Arch. Intern. Med.* 161 (2001) 2325-2333.
- <sup>47</sup> D. J. Hunter, S. E. Hankinson, F. Laden, G. A. Colditz, J. E. Manson, W. C. Willett, F. E. Speizer, M. S. Wolff, Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 1253-1258.
- <sup>48</sup> M. S. Wolff, G. S. Berkowitz, S. Brower, I. J. Bleiweiss, P. Tarter, B. Pace, N. Roy, S. Wallenstein, A. Weston, Organochlorine exposures and breast Cancer risk in New York city women, *Environ. Res.* 84 (2000) 151-161
- <sup>49</sup> S. Haider, R. M. Inbaraj, Relative toxicity of technical material and commercial formulation of malathion and endosulfan to a freshwater fish, *Channa Punctatus* (Bloch), *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 11 (1986) 347-351.
- <sup>50</sup> U.S. Environmental Protection Agency. *Integrated Risk Information System*; Washington, D.C., 1995.
- <sup>51</sup> Miller, G. T. Jr. Ed., *Living in the Environment- Principle, Connections, and Solutions*, Wadsworth Publishing Co., Belmont, 1994, pp. 598.
- <sup>52</sup> S. A. Senseman, T. L. Lavy, B. W. Skulman, Trace level pesticide detections in arkansas surface waters, *Environ. Sci. Tech.* 31 (1997) 395-341.
- <sup>53</sup> S. M. Waliszewski, V. T. Pardío, K. N. Waliszewski, J. N. Chantiri, A. A. Aguirre, R. M. Infanzón, J. Rivera, *Sci. Total Environ.* 208 (1997) 127-132.
- <sup>54</sup> V. Schinas, M. Leotsinidis, A. Alexopoulos, Organochlorine pesticide residues in human breast milk from southwest greece: associations with weekly food consumption patterns of mothers, *Arch. Environ. Health.* 55 (2000) 411-417.
- <sup>55</sup> Bor-Cheng Han, Woei-Lih Jeng, Tsu-Chang Hung, Yong-Chien Ling, Ming-Jer Shieh, Ling-Chu. Chien, Estimation of metal and organochlorine pesticide exposures and potential health threat by consumption of oysters in Taiwan, *Environ. Pollut.* 109 (2000) 147-156
- <sup>56</sup> K. S. Guruge, M. Watanabe, H. Tanaka, S. Tanabe, Accumulation status of persistent organochlorines in albatrosses from the North Pacific and the Southern Ocean, *Environ. Pollut.* 114 (2001) 389-398.

- 
- <sup>57</sup> Henry A. Alergia, Terry F. Bidleman, Timothy J. Shaw, Organochlorine pesticides in ambient air of Belize, central America, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 1953-1958.
- <sup>58</sup> Robert G. M. Lee, Victoria Burnett, Tom Harner, Kevin C. Jones, Short-term temperature-dependent air-surface exchange and atmospheric concentrations of polychlorinated naphthalenes and organochlorine pesticides, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 393.
- <sup>59</sup> Y. C. Ling, I. P. Huang, Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 695 (1995) 75-82.
- <sup>60</sup> I. Schechter, S. Hassoon, A sensitive fluorescence probe for DDT-type pesticides, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 77-82.
- <sup>61</sup> L. Comellas, J. L. Lliberia, A. Roca, Determination of organochlorine compounds in anion-exchange resins by UV irradiation and ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 57-62.
- <sup>62</sup> C. Crespo, R. M. Marce, F. Borrull, Determination of various pesticides using membrane extraction discs and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 135-144.
- <sup>63</sup> R. Eisert, K. Levsten, G. Wunsch, Element-selective detection of pesticides by gas chromatography—atomic emission detection and solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 175-186.
- <sup>64</sup> G. Achilli, G. P. Cellerino, G. M. D'Eril, S. Bird, Simultaneous determination of 27 phenols and herbicides in water by high-performance liquid chromatography with multielectrode electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 357-362.
- <sup>65</sup> R. S. Hoffman, R. Morasco, L. R. Goldfrank, Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. *J. Toxicol., Clin. Toxicol.* 34 (1996) 259-266.
- <sup>66</sup> W. Liu, A. Kumar, M. Alraja, Excitatory effects of muscarine on septohippocampal neurons: involvement of M receptors, *Brain Res.* 805 (1998) 220-233.
- <sup>67</sup> J. P. Kiss, K. Windisch, K. De Oliveira, E. C. P. Hennings, A. Mike, B. K. Szasz, Differential effect of nicotinic agonists on the [3H]norepinephrine release from rat hippocampal slices, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 943-950.
- <sup>68</sup> Hamers Timo, G. D. S. Mathijis, J. M. Albertinka, Jan H. Koeman, Biological and chemical analysis of the toxic potency of pesticides in rainwater, *Chemosphere* 45 (2001) 609-624.
- <sup>69</sup> M. Terreni, E. Benfenati, M. Natangelo, G. Facchini, G. Pagani, Synthesis and use of pentadeuteroethyl ethofumesate as an internal standard for the determination of ethofumesate and its metabolites in water by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 243-250.
- <sup>70</sup> G. D. Teresa, G. C. Agustina, M. D. Nielene, P. V. Piedad, S. L. Francisco, Rapid and sensitive determination of 4-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol, parathion-methyl, fenitrothion, and parathion-ethyl by liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4508-4513.
- <sup>71</sup> R. C. Martinez, E. R. Gonzalo, F. G. Garcia, J. H. Mendez, Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of organophosphorus pesticides in waters with dual electrochemical (reductive—oxidative) detection, *J. Chromatogr. A* 644 (1993) 49-58.
- <sup>72</sup> Patrick Durand and Daniel Thomas, *Journal of environmental pathology, toxicology, and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and*

---

*Cancer*, 5 (1984) 51.

<sup>73</sup> I. C. Palchetti, C. Andrea, D. C. Michele, M. M. Claudio, A. P. F. Turner, Determination of anticholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 315-321.

<sup>74</sup> J. M. Abad, F. Pariente, L. Hernandez, H. D. Abruna, E. Lorenzo, Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2848-2855.

<sup>75</sup> D. Martorell, F. Cespeses, E. Martinez-Fabregas, S. A. Legret, Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite, *Anal. Chim. Acta* 290 (1994) 343-348.

<sup>76</sup> R. T. Andres, R. Narayanaswamy, Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue, *Talanta* 49 (1997) 1335-1352.

<sup>77</sup> D. Barcelo, S. Lacorte, J. L. Marty, Validation of an enzymatic biosensor with liquid chromatography for pesticide monitoring, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 334-340.

<sup>78</sup> A. S. Miquel, M. Arben, A. Salvador, Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 35-44.

<sup>79</sup> K. Rekha, M. D. Gouda, M. S. Thakur, N. G. Karanth, Ascorbate oxidase based amperometric biosensor for organophosphorous pesticide monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 499-502.

<sup>80</sup> Jean-Luc Besombes, S. Cosnier, Pierre Labbe, Gilbert Reverdy, A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides, *Anal. Chim. Acta* 311(1995) 255-263.

<sup>81</sup> W. R. Everett, G. A. Rechnitz, Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorus pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor, *Anal. Chem.* 70 (1998) 807-810.

<sup>82</sup> A. Mulchandani, P. Mulchandani, L. Chen, Amperometric thick-film strip electrodes for monitoring organophosphate nerve agents based on immobilized organophosphorus hydrolase, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2246-2249.

<sup>83</sup> S. A. Wring, J. P. Hart, L. Bracey, B. J. Birch, Development of screen-printed carbon electrodes, chemically modified with cobalt phthalocyanine, for electrochemical sensor applications, *Anal. Chim. Acta.* 231 (1990) 203-212.

<sup>84</sup> J. P. Hart, I. C. Hartley, Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor, *Analyst* 119 (1994) 259-263.

<sup>85</sup> J. Wang, P. V. A. Pamidi, Disposable screen-printed electrodes for monitoring hydrazines, *Talanta* 42 (1995) 463-467.

<sup>86</sup> J. Wang, F. Lu, D. MacDonald, J. Lu, M. E. S. Ozsoz, K. R. Rogers, Screen-printed voltammetric sensor for TNT, *Talanta* 46 (1998) 1405-1412.

<sup>87</sup> J. Wang, M. Pedrero, X. Cai, Palladium-doped screen-printed electrodes for monitoring formaldehyde, *Analyst* 120 (1995) 1969-1972.

<sup>88</sup> J. Park, J.-Y. Choi, K. Seo, S.-R. Cho, J.-R. Oh, S.-H. Kahng, Screen-printed anodic stripping voltammetric sensor containing HgO for heavy metal analysis, *Anal. Chim. Acta.* 443 (2001) 241-247.

<sup>89</sup> J.-M. Zen, Y. Shih, An electrochemical sensor based on a clay-coated screen-printed electrode for the determination of arbutin, *Anal. Chim. Acta.* 412 (2000) 63-68.

<sup>90</sup> R. Nagata, S. A. Clark, K. Yokoyama, I. K. Tamiya, Amperometric glucose biosensor manufactured by a printing technique, *Anal. Chim. Acta.* 304 (1995) 157-164.



- 
- <sup>91</sup> M. B. Madaras, R. Buck, Miniaturized biosensors employing electropolymerized permselective films and their use for creatinine assays in human serum, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3832-3839.
- <sup>92</sup> X.-E. Zhang, F. Ge, Z.-P. Zhang, X.-M. Zhang, Simultaneous determination of maltose and glucose using a screen-printed electrode system, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 333-339.
- <sup>93</sup> G. A. Evtugyn, E.V. Gogol, J.-L. Marty, H. C. Budnikov, V. G. Wintner, Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors, *Talanta* 53 (2000) 379-389.
- <sup>94</sup> Tomlin, C.D.S., *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 10 Edition, British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1997.
- <sup>95</sup> U.S. Environmental Protection Agency, Guidance for the Re-registration of Pesticide Products Containing Propanil as the Active Ingredient, USEPA Case 0226, 12-23-87, U. S. Gov. Printing Office, Washington DC, 1987.
- <sup>96</sup> <http://www.epa.gov/iris/subst/0186.htm>
- <sup>97</sup> C. F. Cuff, W. Zhao, T. Nukui, R. Schafer, J. B. Barnett, 3,4-Dichloropropionanilide-Induced Atrophy of the Thymus : Mechanisms of Toxicity and Recovery, *Fundam. Appl. Toxicol.* 33 (1996) 83-90.
- <sup>98</sup> M. Eddleston, M. Rajapakshe, D. Roberts, K. Reginald, M. H. Rezvi Sheriff, W. Dissanayake, N. Buckley, Severe propanil [N-(3,4-dichlorophenyl) propanamide] pesticide self-poisoning, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40 (2002) 847-854.
- <sup>99</sup> H. A. Moye, C. J. Miles, Postcolumn photolysis of pesticides for fluorometric determination by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 60 (1988) 220-226.
- <sup>100</sup> D. Barceló, I. Ferrer, Determination and stability of pesticides in freeze-dried water samples by automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode-array detection, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 93-99.
- <sup>101</sup> M. Natangelo, S. Tavazzi, R. Fanelli, E. Benfenati, Analysis of some pesticides in water samples using solid-phase microextraction-gas chromatography with different mass spectrometric techniques, *J. of Chromatogr. A* 859 (1999) 193-201.
- <sup>102</sup> J. Begerow, K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure, *J. of Chromatogr. B* 755 (2001) 215-228.
- <sup>103</sup> N. Priyantha, D. Weerabahu, Amperometric sensor for Propanil, *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 263-268.
- <sup>104</sup> A. M. Oliveira Brett, E. M. Garrido, J. L. F. C. Lima, C. Delerue-Matos, F. Borges, A. M. S. Silva, Electrochemical oxidation of propanil and related N-substituted amides, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 35-41.
- <sup>105</sup> F. Borges, E. M. Garrido, J. L. F. C. Lima, C. Delerue-Matos, A. M. S. Silva, J. A. P. Piedade, A. M. Oliveira Brett, Electrochemical and spectroscopic studies of the oxidation mechanism of the herbicide Propanil, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 876-879.
- <sup>106</sup> R. E. Hoagland, G. Graf, An aryl acylamidase from tulip which hydrolyzes 3',4'-dichloropropionanilide, *Phytochemistry* 11 (1972) 521-527.
- <sup>107</sup> G. Engelhardt, P. R. Wallinofer, R. Plapp, Purification and properties of an aryl acylamidase of *Bacillus sphaericus*, catalyzing the hydrolysis of various phenylamide herbicides and fungicides, *Appl. Microbiol.* 26 (1973) 709-718.
- <sup>108</sup> World Health Organization, Chlorophenols other than pentachlorophenol, *International Programme on Chemical Safety- Environmental Health Criteria* 93, World Health Organization, Geneva, 1989.
- <sup>109</sup> IARC, Re-evaluation of some organic chemicals, Hydrazine, and Hydrogen Peroxide,

---

*IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 71, IARC Press, Lyon, France, 1999, pp. 769-816.

<sup>110</sup> National Cancer Institute, *Bioassay of 2,4,6-trichlorophenol for possible carcinogenicity*, National Cancer Institute, Bethesda, MD, 1979 (NCI-CG-TR-155).

<sup>111</sup> US Environmental Protection Agency, *Phenols, U.S. EPA Method 604*, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1985 (40 CFR part 136).

<sup>112</sup> Office of Solid Waste, Gas chromatography/mass spectrometry for semi-volatile organics, capillary column technique, test method for evaluating solid waste, *U.S. EPA Method 8270, 3rd ed.*, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1986 (SW 846).

<sup>113</sup> P. Bartels, E. Ebeling, B. Krämer, H. Kruse, N. Osius, K. Vowinkel, O. Wassermann, J. Witten, C. Zorn, Determination of chlorophenols in urine of children and suggestion of reference values, *Fresenius J. Anal. Chem.* 365 (1999) 458-464.

<sup>114</sup> R. P. Schneider, C. L. Gabelish, P. Crisp, Simultaneous determination of chlorophenols chlorobenzenes and chlorobenzoates in microbial solutions using pentafluorobenzylbromide derivatization and analysis by gas chromatography with electron-capture detection, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 215-228.

<sup>115</sup> J. Pawllszyn, K. D. Buchholz, Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols, *Anal. Chem.* 66 (1994) 160-167.

<sup>116</sup> J.-F. Jen, M.-C. Wei, Determination of chlorophenols in soil samples by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 111-118.

<sup>117</sup> J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, D. Dabrowska, R. Kartanowicz, Simultaneous Determination of selected phenoxyacid herbicides and chlorophenols in surface and seawater by HPLC coupled to DAD, *Anal. Lett.* 37 (2004) 545-560.

<sup>118</sup> J. H. T. Luong, S. Zhao, An electrocatalytic approach for the measurement of chlorophenols, *Anal. Chim. Acta* 327 (1996) 235-242.

<sup>119</sup> T. Yao, K. Kotegawa, A flow injection biosensor system for highly selective detection of 2,4,6-trichlorophenol based on preoxidation by ceric sulfate, *Anal. Sci.* 19 (2003) 829-833.

<sup>120</sup> T. Nyokong, T. Mafatle, Use of cobalt(II) phthalocyanine to improve the sensitivity and stability of glassy carbon electrodes for the detection of cresols, chlorophenols and phenol, *Anal. Chim. Acta* 354 (1997) 307-314.

<sup>121</sup> J. Wang, S.-P. Chen, M. S. Lin, Use of different electropolymerization conditions for controlling the size-exclusion selectivity at polyaniline, polypyrrole and polyphenol films, *J. Electroanal. Chem.* 273 (1989) 231-242.

<sup>122</sup> J. F. Hedenburg, H. Freiser, Anodic voltammetry of phenols, *Anal. Chem.* 66 (1953) 1355-1358.

<sup>123</sup> Survey of 400 US readers from T&M Word, EDN, Design, News, and R&D Magazines, March 2002.

<sup>124</sup> IARC, Overall evaluations of carcinogenicity, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Supplement 7, IARC Press, Lyon, France, 1987, p207.

<sup>125</sup> P. A. Cruickshank, H. C. Jarrow, Ethylenethiourea degradation, *J. Agric. Food Chem.*, 21 (1973) 333-335.

<sup>126</sup> R. E. Hoagland, A. E. Frear, Behavior and fate of ethylenethiourea in plants, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 129-133.

<sup>127</sup> R. R. King, Derivatization of ethylenethiourea with m-trifluoromethylbenzyl chloride for analysis by electron-capture gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 73-75.

<sup>128</sup> USDA, Field crops. Final estimates 1992-1997, *National Agriculture Statistics Service*

- 
- Statistical Bulletin*, No. 947, USDA, 1998, p107, <http://www.usda.gov/nass/pubs/histdata.htm>.
- <sup>129</sup> USDA, Field crops. Final estimates 1997-2002, *National Agriculture Statistics Service Statistical Bulletin*, No. 982, USDA, 2004, p109, <http://www.usda.gov/nass/pubs/histdata.htm>.
- <sup>130</sup> IARC, Overall evaluations of carcinogenicity, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Supplement 7, IARC Press, Lyon, France, 1987, p359.
- <sup>131</sup> IARC, Tobacco smoking, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, vol. 38, IARC Press, Lyon, France, 1986, 421 pp.
- <sup>132</sup> N. L. Benowitz, The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease, *Prev. Med.* 26 (1997) 412-417.
- <sup>133</sup> L. P. Dwoskin, P. A. Crooks, Contribution of CNS nicotine metabolites to the neuropharmacological effects of nicotine and tobacco smoking, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 743-753.
- <sup>134</sup> T. P. George, C. D. Verrico, R. H. Roth, Effects of repeated nicotine pre-treatment on mesoprefrontal dopaminergic and behavioral responses to acute footshock stress, *Brain Res.* 801 (1998) 36-49.
- <sup>135</sup> A. J. Rogers, L. D. Denk, P. M. Wax, Catastrophic brain injury after nicotine insecticide ingestion, *J. Emerg. Med.* 26 (2004) 169-172.
- <sup>136</sup> J. F. Pankow, A consideration of the role of gas particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1965-1980.
- <sup>137</sup> E. Leete, in: S. W. Pelletier (Ed.), *Alkaloids Chemical and Biological Perspectives*, Vol. I, Wiley, New York, 1983, p. 86.
- <sup>138</sup> M. Osler, *Preventative Medicine*. 27 (1998) 438-443.
- <sup>139</sup> B. Siegmund, E. Leitner, W. Pfannhauser, Determination of the nicotine content of various edible nightshades (solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake, *J. Agri. Food Chem.* 47 (1999) 3113-3120.
- <sup>140</sup> B. Siegmund, E. Leitner, W. Pfannhauser, Development of a simple sample preparation technique for gas chromatographic-mass spectrometric determination of nicotine in edible nightshades (Solanaceae), *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 249-260.
- <sup>141</sup> S. A. Al-Tamrah, Spectrophotometric determination of nicotine, *Anal. Chim. Acta* 379 (1999) 75-80.
- <sup>142</sup> C. Oddoze, A. M. Pauli, J. Pastor, Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines, *J. Chromatogr. B* 708 (1998) 95-101.
- <sup>143</sup> H. James, Y. Tizabi, R. Taylor, Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 840 (1998) 87-93.
- <sup>144</sup> B. Siegmund, D. E. Leyden, E. Zikulnig, E. Leitner, M. Murkovic, W. Pfannhauser, H. Reif, The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker, *Food. Chem.* 74 (2001) 259-265.
- <sup>145</sup> E. Cognard, C. Staub, Determination of Nicotine and Its Major Metabolite Cotinine in Plasma or Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Using Ion-Trap Detection, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (2003) 1599-1607.
- <sup>146</sup> E. Davoli, L. Stramare, R. Fanelli, L. Diomede, M. Salmona, Rapid solid-phase extraction method for automated gas chromatographic-mass spectrometric determination of nicotine in

---

plasma, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 312-316.

<sup>147</sup> H. Shin, J. Kim, Y. Shin, S. Jee, Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 177-183.

<sup>148</sup> A. A. M. Stolker, W. Niesing, E. A. Hogendoorn, A. B. Rambali, W. Vleeming, Determination of nicotine and cotinine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 35-43.

<sup>149</sup> M. R. Clench, E. E. K. Baidoo, R. F. Smith, L. W. Tetler, Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 303-313.

<sup>150</sup> L. Campanella, G. Favero, M. Tomassetti, Direct determination of nicotine in antismoking pharmaceutical products and in tobacco using an inhibition biosensor, *Anal. Letters*. 34 (2001) 855-866.

<sup>151</sup> Y. Tan, J. Yin, C. Liang, H. Peng, L. Nie, S. Yao, A study of a new TSM bio-mimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine, *Bioelectrochemistry* 53 (2001) 141-148.

## Full Paper

# A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Based Chemical Sensor for Cathodic Determination of Hydrogen Peroxide

Meng Shan Lin,\* Hoang Jyh Leu

Department of Chemistry, Tamkang University, Tamsui 25137, Taiwan

\*e-mail: mslin@mail.tku.edu.tw

Received: April 5, 2005

Accepted: May 26, 2005

## Abstract

A new cathodic scheme for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) measurement by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-based chemical sensor was described. The unique characteristic of electrocatalytic property was firstly investigated by voltammetry. And then the amperometric response of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured at  $-0.2$  V (vs. Ag/AgCl) by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modified glassy carbon rotating disk electrode. The kinetic parameter was also calculated from Koutecky-Levich plot, and the value was  $6.4 \times 10^{-4}$  cm s<sup>-1</sup> in pH 3 citrate buffer. In order to benefit the possible biomedical applications, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan modified electrode was also investigated in this experiment. There were several characteristic enhancements by the coated chitosan thin film for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor. The calibration curves were found to be linear up to 4.0 and 5.0 mM ( $r = 0.999$ ) in pH 3 and 7 with the detection limits of 7.6 and 7.4  $\mu$ M L<sup>-1</sup> ( $S/N = 3$ ). The stability was evaluated by the results of half-life time ( $t_{50\%}$ ) for 9 months at room temperature and 24 months at 4 °C.

**Keywords:** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Hydrogen peroxide, Amperometric, Sensor, Chitosan

## 1. Introduction

A sensitive and convenient detection scheme for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is important in both biomedical and environmental studies. In industrial process, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is widely used in semiconductor, food and plastic applications, and it is also a by-product of aerobic metabolism. Owing to the role of oxidizing agent and the factor of aging process, the excess of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may potentially damage carbohydrates, lipids and proteins in our body. Thus, it is critical to design a useful scheme for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection. Based on the spectroscopy and electrochemistry, numerous detection schemes have been developed for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement, such as fluorimetry [1–4], fiber-optic device [5–6], chemiluminescence [7–11], and various electrochemical [12–18] methods.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is an interesting compound by its nature of electrochemical oxidation or reduction, but the anodic applied potential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection is unfeasible to design. A catalyst modified electrode may provide an adequate solution to reduce interference from easily oxidizable compounds, and a series of metal electrodes, such as platinum, ruthenium and rhodium, have been used to demonstrate the detection scheme through the coupling of flavin-containing oxidase [19–21]. Recently, peroxidase modified electrode was further used in reductive mode as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor, but the biological instability might be overcome in this type of sensor [22–23].

The mixed-valence compound is defined a polynuclear cluster with two or more metal centers linked by bridging ligand [24], and the electrons are delocalized in the whole cluster. From previous researches, this cluster was utilized as an artificial peroxidase to catalyze the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

such as metal hexacyanoferrates [25–28]. And the reductive mode of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantitative analysis probably is one of the important advantages for these inorganic compounds to be used in oxidase-based biomedical sensors [29–30].

Iron oxides possess distinct roles in chemical, medical and industrial fields, and there are approximately six different forms, such as  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematite),  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemite),  $\beta$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,  $\epsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, FeO, and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetite) [31]. Based on the mixed-valence characteristic, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> is also named for binary iron oxide. From previous reports, it has been found in bees or magnetotactic bacteria [32–33] and used for many applications [34]. In order to fabricate an ideally electrochemical sensor, it is critically important to use the applied potential around 0 V. This suitable potential window can be used to avoid the interferences from easily oxidizable compounds and ambient oxygen. In this project, we find Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as an ideal catalyst for us to design this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitive chemical sensor.

Chitosan is a naturally occurred biopolymer product found in the exoskeleton of crustaceans. The features of low cost, nontoxicity, high adhesion, biodegradability, biocompatibility, small membrane pore size, terminal amino group, and high mechanical strength make it as a promising matrix for the possible applications of permselectivity [35] and enzyme immobilization [36]. Many papers have reported the size exclusion effect of chitosan membrane for biosensor applications [37–39]. Besides, this membrane can provide a biocompatible environment for enzyme immobilization, and the common interferences can be eliminated in the biological condition [40].

In current project, we have described a simple method to develop the interference free electrochemical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensor.

The  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified glassy carbon rotating disk electrode has been used to reach the unique features of electrocatalytic reduction and interference elimination. Therefore, this new  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor has been demonstrated at cathodic potential, and chitosan coated thin film provides several characteristic enhancements in both biological and environmental situations. In contrast to previous sensors, this  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -based  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor has shown the advantages of low applied potential, low background current, rapid response, limited interference, and long-term stability.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Iron(II,III) oxide powder, glutaraldehyde (50% aqueous solution) and chitosan (poly(D-glucosamine); medium molecular weight, MW  $1.9\text{--}3.1 \times 10^5$ ; 81.4% deacetylation chitin) were obtained from Aldrich (Millwaukee, Winsconsin, USA). All other chemicals were of analytical grade and purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) without further purification. De-ionized water was used to make up all the buffer solutions and pretreated from Barnstead water purification system with a  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  bacterial filter (Easypure Ro and Easypure UV/UF, IW, USA). The conductive carbon ink (C10903D14) was obtained from Gwent Electronic Materials Ltd. (Pontypool, UK). All the gases used throughout this study were obtained from the local supplier with purity of 99.99%.

### 2.2. Apparatus

Cyclic voltammetry was used to study the electrocatalytic property of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode, the reduction mechanism of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and the surface condition of bare electrode. A CHI 750A electrochemical workstation (CH Instrument, Austin, USA) was conducted in this whole project.

A bi-potentiostat (AFRDE5, PINE, PA, USA) was used to control the applied potential in a three-electrode configuration for all the steady-state amperometric measurements. This system contains a glassy carbon rotating disk electrode (5.0 mm diameter, AFE3T050, PINE) with a motor controlled rotor (AFMSRX, PINE), an Ag/AgCl reference electrode (3 M KCl), and a platinum wire (99.95% purity) counter electrode. All the amperometric data were recorded with a strip chart recorder (Linear MF1201, Alltech, Deerfield, IL, USA).

The pH measurements were carried out with a glass electrode and a pH meter (Suntex, local supplier). The buffer solution was controlled at  $25^\circ\text{C}$  by a home-made electrochemical cell with a constant temperature circulatory system (Model B402, Firstek, local supplier).

### 2.3. Preparation of the Modified Electrodes

In both steady-state amperometric and voltammetric experiments, the surface of rotating disk electrode (RDE) was firstly polished with  $0.1$  and  $0.05\text{ }\mu\text{m}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  powder, respectively. Subsequently, it was sonicated for 5 minutes twice after each polish and then checked by cyclic voltammetric scans carefully before each experiment.

All the modified electrodes were prepared by using drop-coating technique. For  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode, the mixture of modified ink was prepared by thorough mixing of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  powder, carbon ink, and cyclohexanone. The final weight ratio of suspension mixture is 1:1:8, respectively. And  $5.0\text{ }\mu\text{L}$  of above mixture was placed onto the inverted bare RDE and allowed to dry at room temperature for 30 minutes. The thickness of this  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  thin layer was  $0.05\text{ }\mu\text{m}$ , and its reproducibility was checked below 5% (RSD,  $n = 20$ ) through response current. When not in use, it was kept in dry condition at  $4^\circ\text{C}$ .

For  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan electrode preparation, it was fabricated in the same way by drop-coating technique. In a typical procedure, 0.5% chitosan stock solution was firstly prepared by dissolving chitosan in hot 1% acetic acid solution. And the  $4\text{ }\mu\text{L}$  of above chitosan solution was placed on the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode and then air-dried. Afterward, the  $5\text{ }\mu\text{L}$  of 1% glutaraldehyde was slowly coated onto the chitosan film and allowed to dry in the same condition for 1 hour. This procedure yielded a robust and strongly adherent composite film with the thickness  $15\text{ }\mu\text{m}$ . Then this electrode was immersed in pH 3 citrate buffer for 20 minutes to remove residual species. And it was also stored in a dry state at  $4^\circ\text{C}$  when not in use.

### 2.4. Electrochemical Measurements in an Electrolytic Cell

For both cyclic voltammetric and steady-state amperometric studies, a  $10\text{ mL}$  of pH 3 citrate buffer with  $0.1\text{ M}$  KCl was placed in a temperature controlled electrochemical cell at  $25^\circ\text{C}$ . The  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  or  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode along with reference and counter electrodes was immersed. The cyclic voltammetric experiments were conducted between  $0.8$  and  $-0.8\text{ V}$  to investigate the electrocatalytic property of these modified electrodes. Also, the amperometric measurements were carried out at  $-0.2\text{ V}$  with rotating speed of  $1225\text{ rpm}$ , and the optimum conditions were carefully investigated in this paper.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Electrochemical Characteristics of Modified Electrodes

In order to design an effective scheme for biomedical and environmental applications, the applied potential is normally aimed near  $0\text{ V}$  for electrochemical sensors. In this project, we continue our quest to search an ideal catalyst for

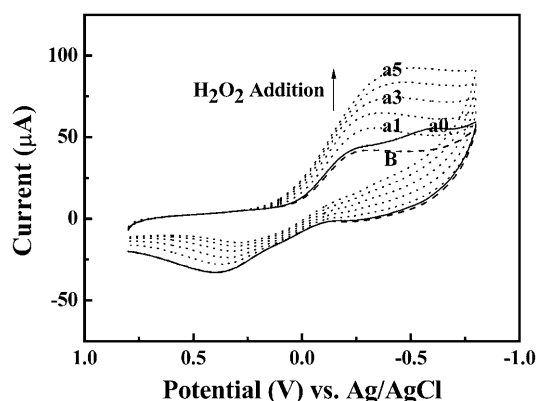


Fig. 1. Typical cyclic voltammograms of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode at absence (curve B) and presence (curve a0) of ambient oxygen. And the subsequent five successive additions of 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  were shown in curve a1 to a5, respectively. The operational conditions: 0.05 M pH 3 citrate buffer with 0.1 M KCl; potential scan rate  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

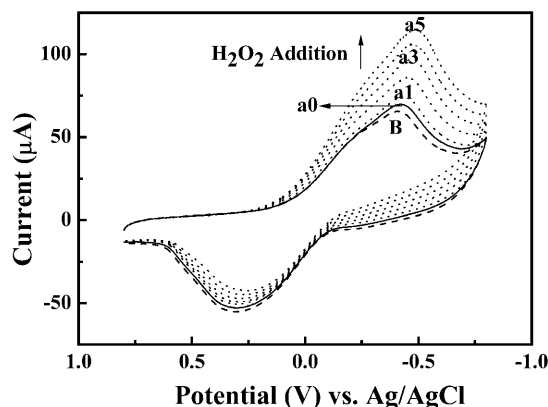


Fig. 2. Cyclic voltammograms of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified electrode in the same conditions as in Figure 1.

$\text{H}_2\text{O}_2$  sensor and make it feasible for medical application. Therefore,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , with the valence-state of Fe(II) and Fe(III), is identified as the catalyst for  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection with limited interference. The reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  proceeds by two-electron, two-proton reduction step to give the product of  $\text{H}_2\text{O}$ , and the reductive valence-state of Fe(II) on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  is oxidized to Fe(III). At this moment, the oxidative valence-state of Fe(III) is regenerated back to original state of Fe(II) at  $-0.2 \text{ V}$  applied potential, and the response is simultaneously recorded. The above electron transfer process is used for this  $\text{H}_2\text{O}_2$  chemical sensor by  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode.

In our proposed scheme,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode was used to investigate the feasibility of  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurement. Series of cyclic voltammetric experiments were executed to illustrate electrochemical behavior between the range of  $+0.8$  and  $-0.8 \text{ V}$  in 0.05 M pH 3 citrate buffer with 0.1 M KCl. In contrast to bare electrode, a distinct  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction from 0.2 V reaches its maximum response around  $-0.4 \text{ V}$  by consecutive addition of 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  as Figure 1 (curve a1

to a5). The influence of ambient oxygen for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode was also compared in Figure 1 (curve B and a0). The current response from oxygen reduction is observed from 0.1 V, and it reaches the maximum peak current around  $-0.6 \text{ V}$ . This behavior indicates that oxygen accompanies reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode.

In this project, a natural polymer of chitosan is coated onto the electrode surface to eliminate the interferences from oxygen or other easily oxidizable compounds, and the modification process is based on the Schiff base reaction [38] by glutaraldehyde and chitosan. Figure 2 shows that  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified electrode is operated in the same condition as Figure 1. There is also an increasing peak current by consecutive addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (curve a1 to a5), which is similar to above experiment. Nevertheless, the oxygen reduction current is late to start from  $-0.25 \text{ V}$  with the maximum reduction peak at  $-0.45 \text{ V}$  (curve B and a0). This behavior indicates that oxygen reduction is slightly changed by chitosan thin film. And the influence of oxygen can be effectively removed by cathodic applied potential of  $-0.2 \text{ V}$  for  $\text{H}_2\text{O}_2$  measurement. The detailed comparison is shown by amperometric response in potential study below. Therefore, this finding can be used to fabricate a new sensor device that provides the advantages of interference free and further biosensor application.

### 3.2. Optimization Study of Hydrogen Peroxide Chemical Sensor

From our preliminary research, the response currents were related to the amount of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , but the background currents were remained at the same level among various percentages of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . This feature is unlike the frequently used catalyst or mediator in conductive ink materials. Therefore, the compositions of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in modified ink mixture between 2 and 18% were carefully studied firstly. The rising amperometric response is corresponded to the higher percentage of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  before 10% of composition, but the response reaches saturated level with higher variation when the composition is higher than 10%. For this reason, 10% of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  is used for the subsequent studies.

The percentage of thinner (cyclohexanone) in preparation of carbon ink mixture was also studied. The major purpose of thinner is used for viscosity adjustment in electrode modification. The response is increased from 50 to 80% of thinner, but other percentages are dramatically decreased. This phenomenon may attribute to the total amount of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  is decreased by excess thinner. Thus, the ratio of 80% thinner is used for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mixture through out this project.

The applied potential for  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduction was also carefully studied in these series optimizations. All the amperometric measurements were carried out in the same buffer condition with 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . From Figure 3, the response current is increased with the increasing applied potential from 0.2 to  $-0.3 \text{ V}$  in both  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified electrodes (full line, curve a, b). The enhancement

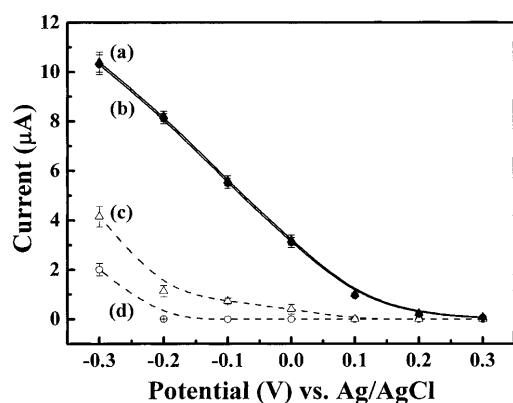


Fig. 3. The applied potential study for 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (full line) and 0.25 mM dissolved oxygen (dashed line) on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (curve a, c) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan (curve b, d) modified electrodes. Other operational conditions:  $-0.2$  V applied potential; 0.05 M pH 3 citrate buffer with 0.1 M KCl; rotating rate 1225 rpm.

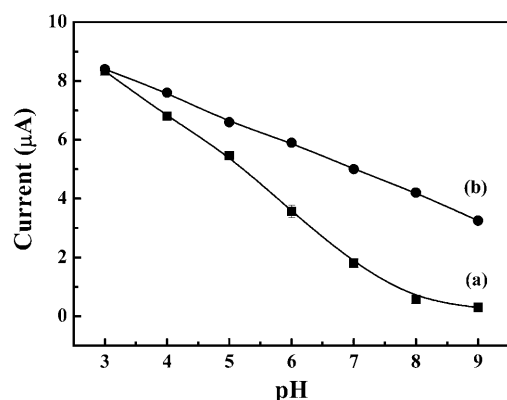


Fig. 4. The pH study for 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (curve a) and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan (curve b) modified electrodes. Other conditions as in Figure 3.

of response is attributed to the increasing driving force for electrochemical reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode. At this point of view, we also find the oxygen reduction is increased with the increasing applied potential gradually (dashed line). In curve c, the oxygen reduction current is found after 0.1 V in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode, but it is found after  $-0.2$  V in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode (curve d). Thus, the optimum potential is selected at  $-0.2$  V to avoid interferences from ambient oxygen for subsequent studies.

Figure 4 shows the pH dependent behavior from  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode with (curve b) or without (curve a) chitosan thin film, and the slopes from response currents are  $-0.9$  and  $-1.7$   $\mu\text{A}/\text{pH}$  between pH 3 and 8, respectively. This result indicates the pH dependent behavior has gone down by  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode. For this reason, the response from  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan composite is enhanced about 3-fold in the case of pH 7. However, the pH 3 citrate buffer is chosen during optimization process, but this finding in pH 7 indicates that  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode is

feasible for oxidase-based biosensor applications in biological condition.

The rotating speed in RDE experiment is also critically important for steady-state responses. In order to characterize the mass-transfer behavior, the rotating speeds were carefully studied between 25 and 2500 rpm. The mass-transfer controlled region is up to 625 rpm in Levich plot, and then the plot soon reaches steady-state around 1225 rpm in both  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan electrodes. This result indicates that the mass-transfer independent region can be reached higher than 1225 rpm. Thus, 1225 rpm is controlled for subsequent studies.

This hydrodynamic experiment also indicates the kinetic parameter of modified electrode. Thus, the overall rate constant ( $k^0$ ) was calculated from Koutecky-Levich plot. The values are  $6.4 \times 10^{-4}$ ,  $6.0 \times 10^{-4}$ , and  $4.0 \times 10^{-5}$   $\text{cm s}^{-1}$  at  $-0.2$  V for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan, and bare electrodes, respectively. In contrast to the bare electrode, there are about 16-fold and 15-fold overall rate constant enhancements for the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrodes.

### 3.3. Analytical Preference of Hydrogen Peroxide Chemical Sensor

Figure 5 illustrates the typical calibration plots over the range of 0.025 to 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in different pH, and the actual response for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode in pH 3 is also shown as inset. From this result, the  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrodes (curve a, b) possess longer linearity range than the electrodes without chitosan (curve c, d) in corresponding pH. The detail comparison of analytical performance is summarized as Table 1, and the extension of linearity for chitosan coated thin film in pH 3 and 7 is about 3-fold and 5-fold, respectively.

In optimum pH, the linearity of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode is up to 4.0 mM with sensitivity of  $16.8 \mu\text{A mM}^{-1}$  ( $r=0.999$ ). A detection limit of  $7.6 \mu\text{M}$  is also obtained ( $S/N=3$ ). The precision value from RSD is 2.2% by twenty successive measurements of 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A typical response time between 10 and 90% of steady-state response is 5.2 s at the injection of 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Besides, all the above characteristics were also estimated in pH 7. The linearity, sensitivity, detection limit, precision, and response time are 5.0 mM,  $9.6 \mu\text{A mM}^{-1}$ ,  $7.4 \mu\text{M}$ , 2.3%, and 5.2 s, respectively in biological pH.

The major interferences are carefully evaluated for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan modified electrode in both optimum and biological pH, such as oxygen, uric acid, ascorbic acid, acetaminophen and 1,4-dihydroxyquinone. Based on the features of reductive mode detection and chitosan coated thin film, no significant response is observed from aforementioned interferences (0.5 mM) at both pH values in the presence or absence of 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Finally, the half-life,  $t_{50\%}$ , of this  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor was also studied. When this sensor is kept under room temperature after use, the half-life time is near 9 months based on weekly evaluation. However, the half-life time can be extended to 2



Table 1. Statistical data for calibration graphs and performance using different composite of modified electrodes and solution pH.

Electrode	pH	Linear range [a] (mM)	Sensitivity ( $\mu\text{A mM}^{-1}$ )	Response time [b] (s)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	7	0.025–1.0	3.6	5.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	3	0.025–1.25	17.2	4.9
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$	7	0.025–5.0	9.6	5.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$	3	0.025–4.0	16.8	5.2

[a] The correlation coefficient of linear range is controlled in 0.999.

[b] The response time is calculated between 10 and 90% of steady-state response.

Table 2. Comparison of the performance of various  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensors based on cathodic measurement schemes in neutral pH solutions.

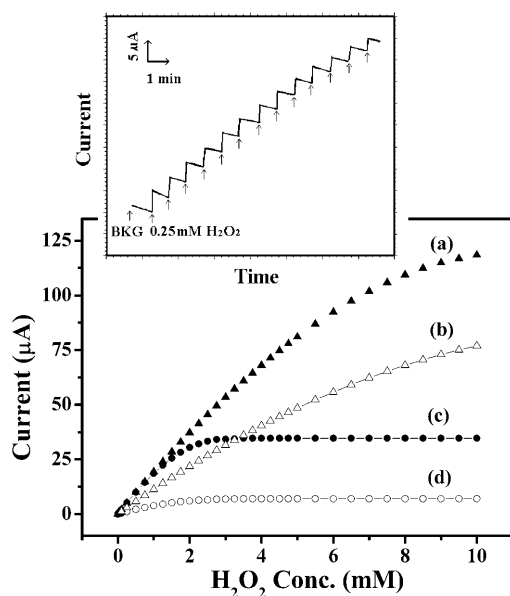
Electrode Modifier	Potential applied (vs. Ag/AgCl) (V)	Linear range (mM)	Sensitivity ( $\mu\text{A mM}^{-1}$ )	Response time (s)	Detection limit [g] ( $\mu\text{M}$ )	Life time [h] (months)
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$ [a]	−0.2	0.025–5.0	9.6	5.2	7.4	24.0 (50%)
CoHCF [b]	0.0	0.005–1.1	224.0	6.5	0.063	0.5 (50%)
HRP/sol-gel/hydrogel [c]	−0.05	0.1–3.4	15.0	10.0	0.5	3.5 (92%)
HCF/HRP/sol-gel/chitosan [d]	−0.1	0.25–3.4	14.86	10.0	3.0	1.0 (85%)
VZrO <sub>2</sub> /graphite/PE [e]	−0.4	0.005–0.4	70.0	–	2.1	–
Al/MnHCF [f]	0.0	0.0006–7.4	194.35	4.7	0.2	3.0 (90%)

[a] Current paper.

[b–f] Results reported in References [42], [23], [40], [41], [28], respectively. The pH values/media in [b] to [f] are pH 6/phosphate, pH 7.5/phosphate, pH 7/phosphate, pH 7/NaCl, and pH 6.5/succinate, respectively.

[g] With  $S/N = 3$ .

[h] After the indicated months of storage, the percentages of remained response.

Fig. 5. Typical calibration curves for  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection by using  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  modified electrode with (curve a, b) or without (curve c, d) chitosan in pH 3 (filled symbol) and 7 (hollow symbol) buffer solutions. And the actual response of curve (a) was shown as inset. Other conditions as in Figure 3.

years when this sensor is stored under  $4^\circ\text{C}$  after use. The difference may attribute to the low temperature which can slow down the deterioration rate of current sensor. And this advantage of long-term stability can't be affected in the different solution pH.

### 3.4. Comparison with Other Sensors and Real Sample Measurements

In neutral pH, a comparison of the performance for this  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified electrode with other  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensors reported in literature is shown in Table 2. All the data from this sensor reveal the properties of low detection potential, prompt response and high stability. In detail,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified electrode can provide a cathodic scheme to minimize the possible interference in various applications, and its life time is longer than other electrochemical scheme, such as peroxidase, Prussian blue and others. Furthermore, chitosan coated thin film may supply a permselective film for prompt  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection in this project.

For possible medical and environmental applications, this  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor was also used to evaluate the feasibility of  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection in various samples as in Table 3. These samples with 20-fold pre-dilution were used as the sample solutions in this experiment. By standard addition method, the results from prediluted sample solutions are obtained and shown in the first column. Then the results of injection 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in various sample solutions is shown in the second column. Finally, the calculated recovery values are shown in the third column.

## 4. Conclusions

We have successfully demonstrated a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{chitosan}$  modified glassy carbon rotating disk electrode as a feasible sensor for  $\text{H}_2\text{O}_2$  detection. Otherwise, this work has the advantages of limited interference, prompt response, good reproducibility.

Table 3. Results of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> analysis in six different sample solutions.

Sample	Value found in diluted sample (mM) [a]	Value found after H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> addition (mM) [b]	Recovery (%)
Serum	0.012	0.489	97.8
Irrigation water	– [c]	0.491	98.2
Tap water	0.009	0.499	99.8
Rainwater	–	0.505	101.0
River water	0.014	0.514	102.8
Seawater	0.011	0.518	103.6

[a] 1:20 dilution with pH 7 phosphate buffer (containing 0.1 M KCl).

[b] The added H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was controlled in 0.5 mM.

[c] No obvious response was found.

bility and long-term stability by the minimum cathodic applied potential for this sensor. It may benefit the future H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection in both biological and environmental applications.

In current scheme, we provide a simple procedure which is suitable for mass production, biomedical, and environmental applications. Thus, this H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chemical sensor can be used to the screen-printed disposable strips and other oxidase-based biosensors which are under intensive investigations currently in our laboratory.

## 5. Acknowledgement

The authors appreciate the financial support from the National Science Council in Taiwan. (Grand No. NSC 92-2113-M-032-018)

## 6. References

- [1] M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392.
- [2] J. Li, P. K. Dasgupta, G. A. Tarver, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1203.
- [3] N. Jie, J. Yang, X. Huang, R. Zhang, Z. Song, *Talanta* **1995**, *42*, 1575.
- [4] R. Rapoport, I. Hanukoglu, D. Sklan, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 309.
- [5] A. C. Pappas, C. D. Stalikas, Y. C. Fiamegos, M. I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *455*, 305.
- [6] J. M. Fernandez-Romero, M. D. Lague De Castro, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3048.
- [7] C. A. Marquette, L. J. Blum, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *381*, 1.
- [8] G. Xu, S. Dong, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1180.
- [9] J. Yuan, A. M. Shiller, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1975.
- [10] M. Stigbrand, E. Ponten, K. Irgum, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1766.
- [11] J. Li, C. Lau, M. Morizono, K. Ohta, M. Kai, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5979.
- [12] M. I. Awad, C. Hamoode, K. Tokuda, T. Ohsaka, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1839.
- [13] S. A. G. Evans, J. M. Elliott, L. M. Andrews, P. N. Bartlett, P. J. Doyle, G. Denuault, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1322.
- [14] L. Mao, P. G. Osborne, K. Yamamoto, T. Kato, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3684.
- [15] T. You, O. Niwa, M. Tomita, S. Hirono, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2080.
- [16] A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1720.
- [17] A. A. Karyakin, E. A. Puganova, I. A. Budashov, I. N. Kurochkin, E. E. Karyakina, V. A. Levchenko, V. N. Matveyenko, S. D. Varfolomeyev, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 474.
- [18] M. S. Vreeke, K. T. Yong, A. Heller, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4247.
- [19] J. Wang, L. Angriest, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 456.
- [20] J. Wang, Q. Chen, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1007.
- [21] J. Wang, J. Liu, L. Chen, F. Lu, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3600.
- [22] B. Wang, B. Li, Z. Wang, G. Xu, Q. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1935.
- [23] B. Wang, J. Zhang, G. Cheng, S. Dong, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, 111.
- [24] D. V. Brown, *Mixed-Valence Compounds*, D. Reidel, Dordrecht, Holland **1980**.
- [25] A. A. Karyakin, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 813.
- [26] M. S. Lin, T. F. Tseng, W. C. Shih, *Analyst* **1998**, *123*, 159.
- [27] R. Garjonyte, A. Malinauskas, *Sens. Actuators B* **1999**, *56*, 93.
- [28] A. Eftekhari, *Talanta* **2001**, *55*, 395.
- [29] M. S. Lin, Y. C. Wu, B. I. Jan, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 56.
- [30] M. S. Lin, W. C. Shih, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *381*, 183.
- [31] U. Schwertmann, R. M. Cornell, *Iron Oxides in the Laboratory*, VCH, Basel **1991**.
- [32] C. Y. Hsu, C. W. Li, *Science* **1994**, *265*, 95.
- [33] R. Blakemore, *Science* **1975**, *190*, 377.
- [34] R. Hirsch, E. Katz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12053.
- [35] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd ed. Wiley-VCH, New York **2000**.
- [36] L. Chen, W. Gorski, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2862.
- [37] M. Yang, Y. Yang, B. Liu, G. Shen, R. Yu, *Sens. Actuators B* **2004**, *101*, 269.
- [38] X. Wei, J. Cruz, W. Gorski, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5039.
- [39] J. Cruz, M. Kawasaki, W. Gorski, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 680.
- [40] Y. Miao, S. N. Tan, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *437*, 87.
- [41] A. Domenech, J. Alarcon, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *452*, 11.
- [42] M. S. Lin, B. I. Jan, *Electroanalysis* **1997**, *9*, 340.

## Improvement of Pulse Amperometric Detection Integrated Automated Flow Injection Analysis of Ethylenethiourea Determination

Meng-Shan Lin\* (林孟山), Jun-Sheng Wang (王俊勝),

Pei-Yan Chen (陳佩彥) and Hsiu-Hsuan Yeh (葉秀炫)

*Department of Chemistry, Tamkang University, Tamsui 25137, Taiwan, R.O.C.*

Improvement of pulse amperometric detection (PAD) method is demonstrated in determination of ethylenethiourea (imidazolidine-2-thione, ETU). The anodic detection of ETU will produce polymeric film on an electrode leading to an inactive electrode surface. Here, the PAD method was used to remove the polymeric film formed on the electrode surface between ETU detection. Further, the scheme was integrated with automated flow injection analysis (AFIA) for determining ETU. The operational parameters of PAD in the AFIA system were discussed thoroughly. The analytical characteristics of the system were evaluated at optimum conditions. The linear range of calibration plot was between 20 to 300  $\mu\text{M}$  (the correlation coefficient,  $r = 0.999$ ) and the detection limit was 0.9  $\mu\text{M}$  ( $S/N = 3$ ). The relative standard deviations of detection of 50  $\mu\text{M}$  ETU were 0.82% with and 9.07% without PAD scheme. The results indicate the system is a very promising tool for ETU determination. Finally, the matrix effects of two water samples that were collected from a campus and a farm show good recoveries of 92% and 96%.

**Keywords:** Pulse amperometric detection; Ethylenethiourea; Automated flow injection analysis.

### INTRODUCTION

The electrochemical phenomenon of the inhibition effect on electrode surfaces has been studied by Bejerano et al.<sup>1</sup> They have shown that the oxidation of iodide and bromide is inhibited in the presence of a small amount of phenol and some of its derivatives.<sup>2</sup> The electrochemical products are generated by oxidative reaction of phenolic compounds.<sup>3</sup> In the meantime, it will accumulate onto electrode surface leading to the electrode inactivation and the hindrance of signal in further electroanalytical measurements. A few reports have endeavored to diminish the problems caused by these polymeric films.<sup>4-7</sup> Nafion<sup>®</sup> was employed to solve this problem, but the sensitivity was poor due to that mass transport of the analyte in the membrane was slower than in solution.<sup>4</sup> Johnson et al. reported an electrochemical method called pulse amperometric detection (PAD) for in situ cleaning and reactivation on a Pt electrode which was severely fouled by a polymeric phenoxy film.<sup>5</sup> Johnson also demonstrated that the PAD was an efficient method to remove the polymeric film on a noble electrode surface. This scheme has been further adopted by Dionex Company (MA, USA) to develop the idea into a commercial scheme.<sup>8</sup>

Here, we report a different polarization scheme from

the conventional PAD<sup>9</sup> to regenerate the surface of an electrode right after each measurement. Ethylenethiourea (imidazolidine-2-thione, ETU), an intermediate in ethylene bisdithiocarbamates (EBDCs) for mulchings can be generated from EBDCs by aeration or during cooking processes and is present in most EBDCs-treated crops.<sup>10,11</sup> EBDCs are an agriculturally important group of fungicides. In 1987, the US Environmental Protection Agency (EPA) monitored the ETU residual amount in 5888 food items and showed that 18% of the samples contained residue of ETU.<sup>12</sup> The residues of ETU have been shown to be carcinogens and teratogens.<sup>13</sup> That is a very severe threat to public health, hence a fast, cheap, and sensitive method for ETU determination should be developed. ETU determination was studied in various reports including LC-spectrometry<sup>14</sup> and electrochemical techniques.<sup>15,16</sup> The sensitivity is better in electrochemical methods than the LC method. However, the copper electrode<sup>15</sup> underwent complex reaction with ETU that caused copper fouling on the electrode surface and the gold electrode<sup>16</sup> is expensive in future applications. A flow injection analysis system (FIA)<sup>17,18</sup> coupled with PAD method on a glassy carbon electrode was used in ETU determination. The advantage of a glassy carbon electrode is that it is more cost-effective than the gold electrode. Two kinds of water samples were also

\* Corresponding author. Fax: +886-2-26299996; e-mail: mslin@mail.tku.edu.tw

adopted for practical application, and both of them showed good recoveries. The scheme also shows good sensitivity and timesaving benefits for ETU determination.

## EXPERIMENTAL

### Apparatus

A flow injection analysis (BAS CC-5 Liquid Chromatography) was carried out in three electrodes configuration that consisted of a glassy carbon working electrode, an Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode (purchased from Bioanalytical Systems, Inc., Indiana, USA) and the stainless flow cell as counter electrode was used for all the electrochemical experiments. A home-made potentiostat (output potential was corrected carefully before experiments) was used to apply oxidative potential. The flow rate was controlled by using a peristaltic pump (Masterflex C/L® U77120-40, Masterflex, USA) and automatic sample injection was performed by the remote-controlled auto-valve (ETMA-CE, Valco, USA). All voltammetric experiments were performed at an electrochemical workstation (CHI 750A, CH Instrument, USA). The Labview software (Labview 5.0, National Instruments, USA) was used to automatically control the pulse generation and signal collection from the AFIA experiments.

### Reagents

The water used in the preparation of all stock solutions was purified by a reverse osmosis system of Easypure RO (Barnstead/Thermolyne, IW, USA) and a reagent grade water system of Easypure UV/UF with a 0.2  $\mu\text{m}$  bacterial filter. All of the stock solutions were prepared daily or stored at 4 °C before use. 0.05 M pH 7 phosphate buffer (Riedel-deHaën, RDH, Seelze, Germany) was used as an electrolyte during the electrochemical measurements. ETU solution was prepared by dissolving ETU (Supelco, Pennsylvania, USA) in a 0.05 M pH 7 phosphate buffer solution (PBS).

### Preparation of the Glassy Carbon Working Electrode

A commercial glassy carbon electrode was used as working electrode in all experiments. The glassy carbon working electrode surface was polished by a 1.0  $\mu\text{m}$  diamond solution (BAS), 0.01  $\mu\text{M}$  and 0.05  $\mu\text{M}$  alumina oxide powder, then sonicated with de-ionized water for 10 minutes twice. Subsequently, the working electrode was checked by a cyclic voltammetric test before use. Two kinds of water samples were collected from a campus and a farm as real samples. Be-

fore AFIA experiments, the real samples were adjusted to PBS pH 7.

## RESULT AND DISCUSSION

The typical cyclic voltammogram of bare glassy carbon electrode in 0.05 M, pH 7 PBS buffer and in 20 mM ETU at 1<sup>st</sup> and 20<sup>th</sup> cycle is shown in Fig. 1. The ETU could be oxidized at an applied potential above 0.6 V (vs. Ag/AgCl) (comparing Fig. 1 A and B) on glassy carbon electrode. After 20 cycles, the oxidation current of ETU is reduced by 54% (Fig. 1 B and C); this may due to some inhibition reaction occurring at the electrode surface. The detailed mechanism between the ETU oxidation product and carbon electrode surface is still under investigation in our laboratory. Since the oxidation of ETU on a glassy carbon electrode causes the electrode to become inactive, the PAD method was adopted to solve the problem of the ETU determination.

### ETU determination

The determination of ETU was performed in the AFIA system. The parameters of AFIA such as applied potential, flow rate, pH and kinds of carrier buffer were studied thoroughly (data not shown). The optimum conditions of AFIA were detection potential at +1.0 V (vs. Ag/AgCl), flow rate 0.5 mL/min in 0.05 M, pH 7 PBS buffer and 1 mM ETU/injection. Fig. 2 (a) is a typical wave form of PAD used in John-

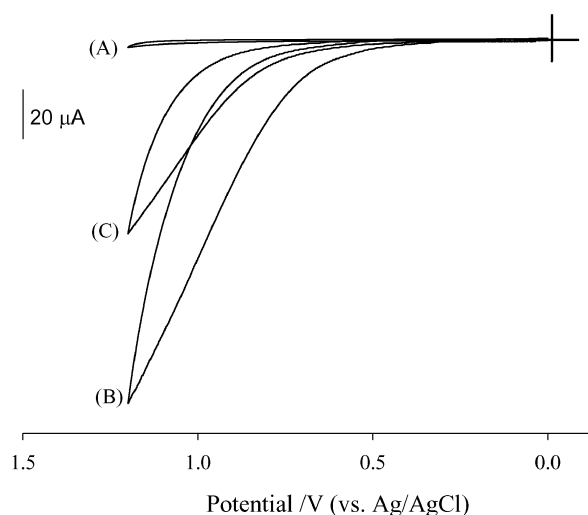


Fig. 1. The typical cyclic voltammogram of ETU behavior. The cyclic voltammogram of blank buffer (A), in 20 mM ETU at 1<sup>st</sup> (B) and 20<sup>th</sup> (C) on bare glassy carbon electrode. Electrolyte: 0.05 M, pH 7 PBS buffer; Scan rate: 50 mV/s.

son's report.<sup>5</sup> The pulse schemes integrated the oxidative measurement potential ( $E_{\text{det}}$ ) of the pulse train and further the electrode was cleaned ( $E_c$ ) and reactivated ( $E_r$ ) at a suitable potential. The waveform that we used in this system is shown in Fig. 2 (b). This technique was an improvement from the traditional PAD method and was developed based on our recent reports.<sup>19,20</sup> The pulse scheme is described below. First, the electrode was equilibrated ( $E_{\text{equ}}$ ) and detected ( $E_{\text{det}}$ ) at the same oxidative potential, and then the continuous pulses were applied to clean and reactivate ( $E_{\text{cr}}$ ) the glassy carbon electrode. Notice, all of the PAD procedures during the progress of experiments were automatically controlled by software.

The parameters of the PAD method that can influence the sensitivity, like pulse frequency, pulse amplitude, and the pulse width, were studied thoroughly. The optimum conditions for pulse frequency, pulse amplitude, and the pulse width are found to be 15 Hz, 0~1.4 V and 20 sec, respectively.

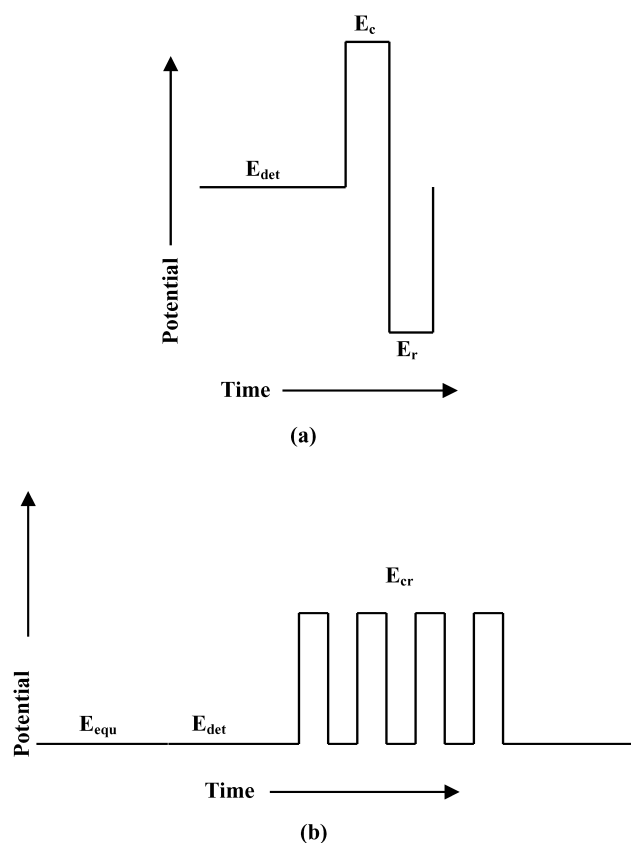


Fig. 2. The pulse amperometric detection scheme in ETU determination. The waveform of PAD in Johnson's report (a), and the typical waveform used in present system (b). Detection potential: +1.0 V (vs. Ag/AgCl); flow rate: 0.5 mL/min; Other conditions as in Fig. 1.

Fig. 3 shows the ratio of relative current with (A) and without (B) pulse treatment in 1 mM ETU determination. After twenty continuous successive measurements, the relative standard deviation of pulse treatment and non-pulse treatment are found to be 0.82% and 9.5%, respectively. It means that the scheme is an efficient technique to clean and reactivate the electrode after each ETU measurement. Fig. 4 shows the typical double logarithmic calibration plot of ETU determination; the linear range is up to 300  $\mu\text{M}$  ( $r = 0.999$ ). The detection limit was found to be 0.9  $\mu\text{M}$  (1.83 ng/20  $\mu\text{L}$ ) ( $S/N = 3$ ). The detection limit is better than the LC method.<sup>14</sup>

To address our work, we extended this system to real

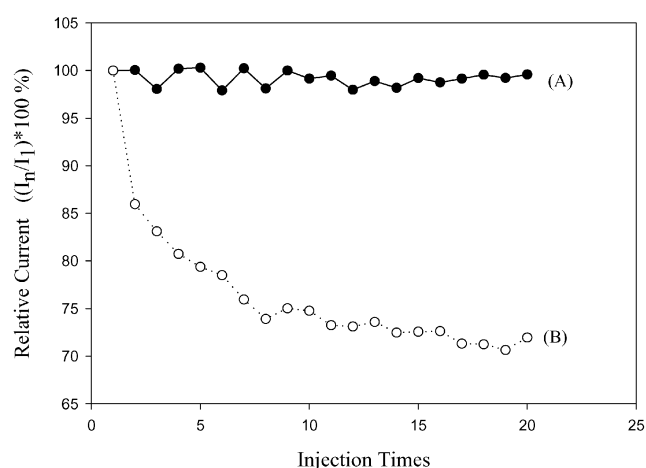


Fig. 3. The twenty times of repetitive experiment of ETU determination was performed with (A) and without (B) pulse amperometric detection in AFIA system. The operation conditions in this work are as in Fig. 2.

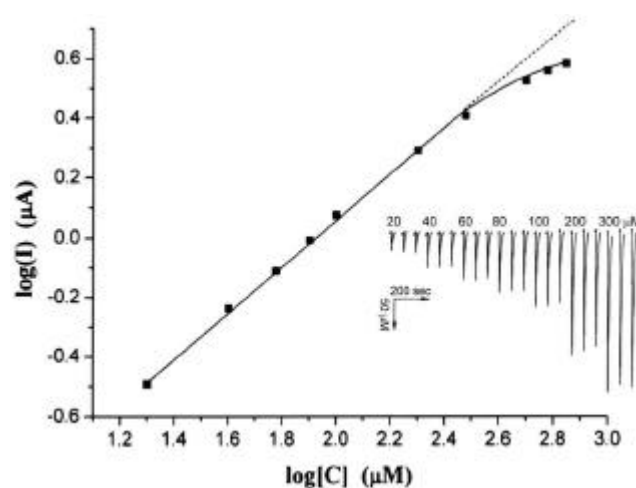


Fig. 4. The calibration plot of ETU determination. The insertion shows actual response of ETU detection. Other conditions are as in Fig. 2.

sample work. Two different water samples were collected from the campus and a farm nearby in Tamsui. The recoveries of two real samples are 92% and 96%, respectively. Both of them show good recoveries of ETU in real water samples determination. The scheme is suitable for integration into complicated systems for environmental applications.

## CONCLUSION

An improvement in the PAD method is demonstrated by ETU determination. The influence of electrode activity can be removed by the PAD method successfully and the deviation can be reduced by the PAD method too. The PAD technique shows high sensitivity and is convenient for ETU detection. AFIA has proven the system to be a scheme that saves time, is easy to operate and does not need specific training. The real sample assays also showed good recovery. In the future we will extend this system to LC-EC application for more practical applications.

## ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful for the financial support from the National Science Council in Taiwan (Grant No. NSC 93-2113-M-032-001-).

Received February 19, 2004.

## REFERENCES

1. Bejerano, T.; Forhacs, C.; Gileadi, E. *J. Electroanal. Chem.* **1970**, 27, 69.
2. Lapuente, R.; Cases, F.; Garcés, P.; Morallon, E.; Vázquez, J. L. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 451, 163.
3. Guiberteau, A.; Galeano Díaz, T.; Salinas, F.; Ortiz, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 305, 219.
4. Yi, H.; Wu, K.; Hu, S.; Cui, D. *Talanta* **2001**, 55, 1205.
5. Koile, R. C.; Johnson, D. C. *Anal. Chem.* **1979**, 51, 741.
6. Carvalho, R. M.; Kubota, L. T.; Rath, S. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 548, 19.
7. Zen, J.-M.; Chung, H.-H.; Kumar, A. S. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 1202.
8. LaCourse, W. R.; Mead, D. A.; Johnson, D. C. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 220.
9. Hsi, T.-S.; Tsai, J.-S. *J. Chin. Chem. Soc.* **1994**, 41, 315.
10. Ripley, B. D.; Cox, D. F. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 1137.
11. Lin, M.-S.; Wang, J.-S. *Electroanalysis* **2004**, 16, 904.
12. Dubey, J. K.; Heberer, T.; Stan, H. J. *J. Chromatogr. A* **1997**, 765, 31.
13. Fishbein, L. *J. Toxicol. Environ. Health* **1976**, 1, 713.
14. Nascimento, P. C.; Bohrer, D.; Garica, S.; Ritzel, A. F. *Analyst* **1997**, 122, 733.
15. Wang, H.; Pacáková, V.; Štulík, K. *J. Chromatogr. A* **1988**, 457, 398.
16. Dai, H.-P.; Shiu, K.-K. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 419, 7.
17. Zen, J.-M.; Chen, P.-Y.; Kumar, A. S. *J. Chin. Chem. Soc.* **2002**, 49, 915.
18. Huang, H.-J.; Chen, M.-C. *J. Chin. Chem. Soc.* **1996**, 43, 387.
19. Lin, M.-S.; Jan, B.-I. *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, 46, 879.
20. Wang, J.; Lin, M. S. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 499.

## Full Paper

# Determination of an Ethylene Bisdithiocarbamate Based Pesticide (Nabam) by Cobalt Phthalocyanine Modified Carbon Ink Electrode

Meng Shan Lin,\* Jun Sheng Wang

Department of Chemistry, Tamkang University, Tamsui 25137, Taiwan

\*e-mail: mslin@mail.tku.edu.tw

Received: April 1, 2003

Final version: July 8, 2003

## Abstract

A phthalocyanine based sensor, for anodic detection of sodium ethylene bisdithiocarbamate (Nabam) by coating a mixture of cobalt phthalocyanine (CoPC) modified carbon ink on the surface of a glassy carbon electrode, has been described. The modified ink was prepared by mixing three percent of cobalt phthalocyanine into carbon ink and then diluting the mixture with cyclohexanone in w/w ratio of 1/9. A suitable portion (or 1  $\mu$ L) of ink mixture was then dip-coated on a rotating disk glassy carbon electrode. The modified ink electrode was air-dried for 15 mins before use. In comparison to the bare ink electrode on which the oxidation of Nabam takes place at 300 mV (vs. 3 M Ag/AgCl), the oxidation potential ( $-125$  mV) of Nabam at the CoPC modified ink decreases significantly. A typical calibration plot of Nabam proportionally increases over the concentration range of 2.5 to 36  $\mu$ M ( $R=0.9990$ ). The detection limit is estimated about 28.8 nM ( $S/N=3$ ) and its response time (between 10% to 90% of steady-state response) is about 5.3 s at the injection of 5  $\mu$ M Nabam. The sensitivity requirement of JMPR meeting (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues) for ethylene bisdithiocarbamates (EBDCs) is achieved by this proposed scheme.

**Keywords:** Ethylene bisdithiocarbamate, Nabam, Cobalt Phthalocyanine

## 1. Introduction

Ethylene bisdithiocarbamate (EBDC) base pesticides (include Nabam, Mancozeb, Ferbam, Maneb, and Zineb) have been widely used as broad-spectrum fungicide, bactericide, and algacide. These have been widely used to control algae in rice field as well as the fungal diseases of cotton, apple, and tomato [1, 2], etc. They are still frequently used in either powder or emulsion formula in many agriculture applications locally. There are serious concerns about the effect of EBDCs toward human toxicity and environmental risk [3]. Nabam and many other ethylene bisdithiocarbamate base pesticides are the topics of an important research area; two special review sections were held due to the presumption of the carcinogenicity and its toxicity of the metabolite of ethylene thiourea (ETU) [3]. Further intensive investigation of the category of ethylene bisdithiocarbamate base pesticides is urgently needed. However, there are not many schemes, which are sensitive enough to meet the requirement of Joint FAO/WHO Meeting of Pesticide Residues (JMPRs) for the detection of ethylene bisdithiocarbamate [4].

The conventional detection schemes of ethylene bisdithiocarbamate are based on the generation of  $CS_2$  in AOAC methods, which is quite tedious. In general, the procedure involves the conversion of ethylene bisdithiocarbamate to carbon disulfide and subsequently measuring the amount of converted  $CS_2$  by titration with iodine. It should be mentioned that a few schemes have been developed for the determination of ethylene bisdithiocarbamates, such as

HPLC-UV [5], gas chromatography [6], spectrophotometry [7–9], mass spectrometry [10], and electrochemical schemes [11–13].

Earlier electrochemical schemes for the measurement of dithiocarbamates involved the use of polarographic [11] and adsorptive stripping voltammetric measurements [12]. However, the sensitivity issue is critical for the possible application needed. Previously, we have reported a cathodic adsorptive stripping voltammetric method [13] for the measurement of Zineb, an ethylene bisdithiocarbamate base pesticide. This scheme provides rapid, sensitive ways for the study of acceptable daily intakes (ADIs). However, the need of using environmental unfriendly mercury electrode, prompt us to redesign a non-mercury based scheme.

This interesting property of CoPC has resulted massive investigation as well as many analytical applications [14–27]. CoPC, a vitamin  $B_{12}$  analogue, possess an electrocatalytic activity toward sulfur containing compounds, such as thiols, and sulfides [14–16]. A few CoPC based schemes have also been developed for the analysis of hydrogen peroxide [17, 18], oxygen [19], and hydrazine [20, 21]. A few types of CoPC based biosensors have been also developed for the sensing of uric acid [22], glucose [23], lactic acid [24], xanthine [25], cholesterol [26], and organo-phosphate [27]. However, there is no report, yet, of an ethylene bisdithiocarbamate pesticide sensor.

In continuation of our interest in this area [13], we describe, herein, another non-mercury based scheme by utilizing cobalt phthalocyanine modified carbon ink elec-

trode to measure Nabam. Current scheme also proposes a potential application to simultaneously monitor both Nabam and its metabolite, ETU. The thiol group of Nabam will first attach to the central metal ion,  $\text{Co}^{2+}$ . Subsequently, the Nabam is oxidized and the reduced metal center  $\text{Co}^+$  can be oxidized to  $\text{Co}^{2+}$  electrochemically. The new scheme possesses a few analytical advantages including rapid response time, relative reasonable linear range and required sensitivity. Current scheme provides equal sensitivity as the stripping one that was previously published by our group [13]. Above all, this method can also be used to determine many of other ethylene bisdithiocarbamate base pesticides with required minor modifications.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

For steady-state amperometric measurements of Nabam, a bi-potentiostat (Model PAR 366A, Princeton Applied Research) was used. The applied voltage was controlled in a three-electrode system for all of amperometric experiments. The measurement cell containing a glassy carbon disk electrode (RDE 0032, Princeton Applied Research) with a motor controlled rotor (Model 636, Princeton Applied Research), a homemade Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode and a platinum (99.95% purity; local supplier) wire counter electrode was used for all the electrochemical experiments. Cyclic voltammetric analyzer (CHI 750A, CH Instrument, USA) was used to study the anodic reaction of Nabam and to conduct all the cyclic voltammetric experiments. The data from steady-state amperometric experiment were recorded with a strip chart recorder (Linear Chart Recorder MF1201, Alltech). The pH measurements were carried out with a Suntex pH meter (local supplier).

### 2.2. Reagents

Water, used for stock solutions preparation, was purified by a reverse osmosis system of Easypure RO (Barnstead/Thermolyne, IW, USA) and a reagent grade water system of Easypure UV/UF with a 0.2  $\mu\text{m}$  bacterial filter. All of the prepared stock solutions were stored at 4 °C before use. All the electrochemical measurements were conducted in a 0.1 M phosphate buffer (Riedel-deHaën, RDH, Seelze, Germany). Nabam solution (2 mM) was prepared by dissolving of Nabam (Chem Service, West Chester, Pennsylvania, USA) in a portion of 5 mL of 0.1 M phosphate buffer of pH 9 solution. The stock solutions of iron chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ), camphor and humic acid (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), sodium dodecyl sulfate (SDS) (Mallinckrodt, Paris, Kentucky, USA), manganese chloride ( $\text{MnCl}_2$ ) (Riedel-deHaën, RDH, Seelze, Germany) were prepared in 0.1 M phosphate buffer solution (pH 9) before use.

### 2.3. Procedure

#### 2.3.1. Pretreatment of the Glassy Carbon Disk Working Electrode

A commercially available rotating disk glassy carbon electrode (5.0 mm diameter of AFMD10580GC, Princeton Applied Research) was used as working electrode in either steady-state experiment or hydrodynamic response on CHI750A. The glassy carbon working electrode surface was polished with 1.0  $\mu\text{m}$  diamond solution (BAS), followed by the sonication for 1 minute in deionized water. The working electrode surface was polished with 0.1 and 0.05  $\mu\text{m}$  alumina oxide powder and it was sonicated for 10 minutes twice. Subsequently, the working electrode was checked by a cyclic voltammetric scan before use.

#### 2.3.2. Preparation of Modified Working Electrode

At first, cobalt phthalocyanine and carbon ink (Gwent Electronic Materials, UK; code number C10903D14) were mixed. Subsequently, cyclohexanone (9 times of total weight of CoPC ink mixture) was added and mixed thoroughly. Finally, 1.0  $\mu\text{L}$  of this CoPC modified ink mixture was pipetted onto a inverted RDE glassy carbon electrode surface and air-dried for 15 minutes in room temperature.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Electrochemical Characteristics of Cobalt Phthalocyanine

The basic measurement principle of Nabam on a CoPC modified ink electrode is based on the oxidation of the complex of CoPC and Nabam by the electrode at the applied potential of 0.0 V (vs. Ag/AgCl). In the preliminary investigation, we have found that the response of CoPC modified ink electrode is more sensitive than either the commercially available bare glassy carbon electrode or the ink electrode (data not shown). In contrast to the bare ink electrode (oxidative peak of Nabam is at +0.3 V), the oxidative peak of CoPC modified ink electrode appears at -0.125 V, i.e., the potential is negatively shifted 0.425 V (Fig. 1). As shown in Figure 1A, there is a typical response of the 3% CoPC modified electrode toward the addition of 0.4 mM Nabam in a phosphate buffer (pH 7).

Significant reversibility improvement of the CoPC modified ink electrode, in contrast to the bare electrode, is also observed. The ratio of oxidative peak versus reductive peak changes from 0.362 (ink electrode) to 0.943 (CoPC modified one). In further scan rate study, the slope of log current vs. log scan rate equals to 0.740, indicating that the response is mixed model of both diffusion and surface adsorption processes. As estimated from calibration plot of a steady-state rotating disk experiment, the sensitivity is improved about 3.4 times as bare ink electrode. A kinetic parameter  $k_f$  value equals  $4.1 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$  is calculated from Koutecky-



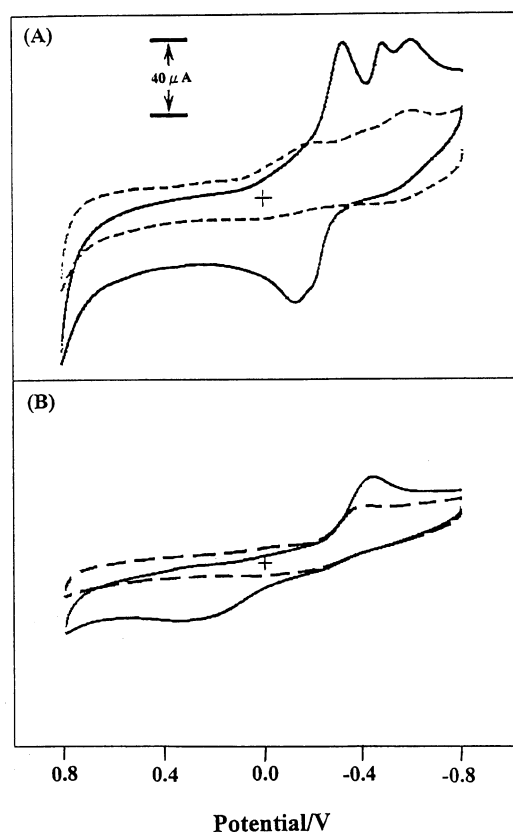


Fig. 1. Typical cyclic voltammograms at the absence (---) and presence 0.4 mM (—) Nabam on cobalt phthalocyanine modified (A) and unmodified ink electrode (B). Other operational conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 7; scan rate, 0.1 V/s.

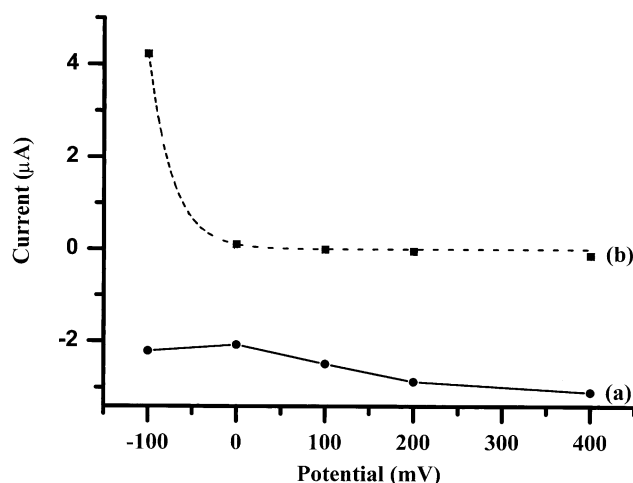


Fig. 2. Potential study. The steady-state responses of 10  $\mu$ M Nabam (a) and Oxygen (b) by cobalt phthalocyanine modified electrode at potential ranging between  $-100$  to  $400$  mV. Operational conditions: 0.1 M phosphate buffer, pH 9.3, and rotating speed: 1600 rpm.

Levich plot at applied potential of 0.0 V in a 0.1 M phosphate buffer of pH 9. In contrast to the bare ink electrode, there is about four fold enhancement of electron transfer rate in the CoPC modified one.

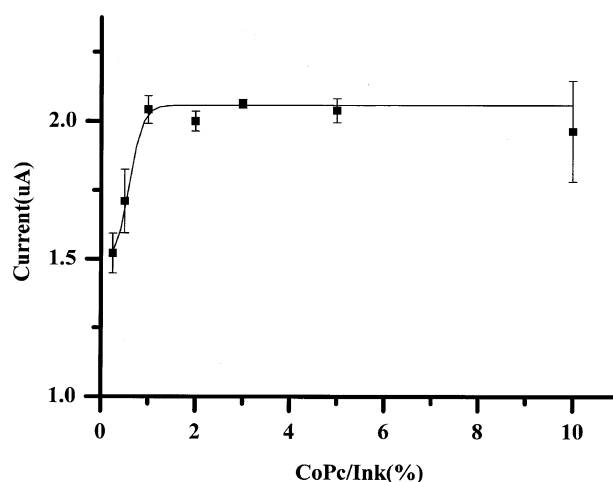


Fig. 3. The composition study. CoPC/ink composition ratio ranging between 0.25 to 10%. Other conditions as in Figure 2.

From preliminary cyclic voltammograms, we have noticed that the applied potential is one of the important parameters in term of the response current. Subsequently, a steady-state potential study was conducted at the presence of 10  $\mu$ M Nabam in 0.1 M phosphate buffer of pH 9.3. The steady-state result of potential study (Fig. 2) indicates the Nabam can be oxidized at the potential around  $-0.1$  V or higher (data shown in Fig. 2a). The potential was chosen at 0.0 V due to the consideration of the minimization of easy oxidizable interference, such as humic acid, ascorbic acid, etc. Figure 2b shows the merits of utilizing operational potential at 0.0 V with limited oxygen interference. The result is also concise with the prediction from cyclic voltammogram in Figure 1A. The sensitivity of CoPC modified electrode, calculated from the current of cyclic voltammetric peaks, indicates sensitivity enhancement of approximately 3 times relative to unmodified one (Fig. 1B).

### 3.2. Optimization Study of Cobalt Phthalocyanine Modified Electrode

The CoPC modified electrode was prepared simply by pipetting a suitable amount of CoPC/Ink mixture to a glassy carbon electrode and air-dried under the cover of an inverted glass beaker. The composition of CoPC modified ink was carefully studied between 0.25 to 10%. The result indicates the response current increases promptly between 0.25 and 1% of CoPC and reaches the plateau between 1 and 10% (Fig. 3). The CoPC composition of 3% seems better reproducibility than other compositions. Thereafter 3% of CoPC modified ink electrode was used throughout the whole investigation.

Acidity is also vitally important to both sensitivity and the response time in oxidation process. Figure 4a shows the response increases as the pH increases and reaches its maximum value at pH 9. On the other hand, the decrease of sensitivity between pH 9.3 and pH 10. Figure 4b indicates

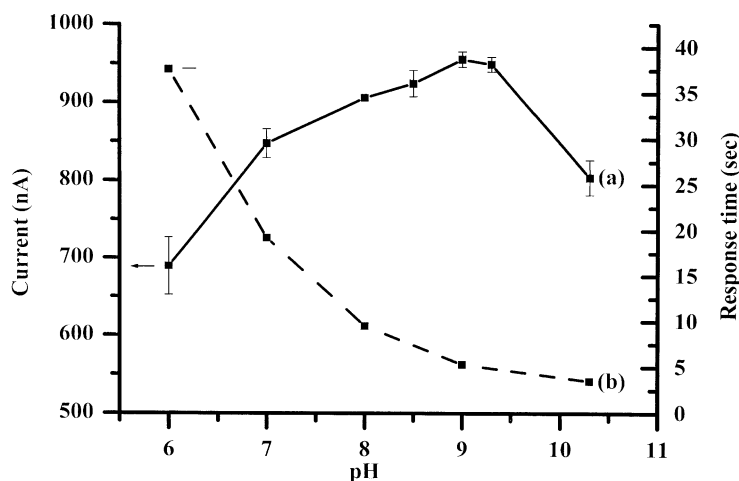


Fig. 4. The optimum pH study of Nabam. Oxidation current (a) and response time (b) between pH ranging from 6 to 10.3. Other conditions as in Figure 2.

that the response time (from 10% to 90% of response) can be significantly reduced at higher pH. The actual response time study at various pH shows response time is changing from 37.6, 19.2, 9.5 and down to 5.3 s at pH 6, 7, 8, and 9, respectively. The response time can be improved down to even 3.5 s at pH 10.3 but the response current is significantly reduced to 84.2% of its sensitivity at solution of pH 9. The types of electrolytes were also investigated briefly. The result indicates the phosphate buffer possesses better sensitivity than borate and glycine buffers. The concentration of buffer/electrolyte was also studied between 0.025 and 0.2 M. The result indicates that the signal is reaching its plateau at the concentration higher than 0.1 M and is significantly reduced at the electrolyte concentration of less than 0.1 M. In consideration of the aforementioned factors, the working solution in the subsequent studies was finally chosen at 0.1 M phosphate buffer pH 9.

It was noted that Nabam decomposes on prolonged exposure to moisture. In preliminary electrochemical experiments, we also found that Nabam is even unstable under acidic condition (pH 3). There is about an 80% decrease due to the severe hydrolysis process observed in the pH 3 solution but there is only about 20% of signal decrease when the pH was changed from 6 to 10. Thus, a more detailed hydrolysis study was conducted at pH 9 (data not shown). The hydrolysis decreased only 5% within the first 90 minutes. Additional study indicated there was a 13% signal decrease in a 12 hours prolong hydrolysis at pH 9. Thus, it implies the hydrolysis is insignificant during a few hours at optimum conditions.

We have also used a UV spectrophotometric scheme to study the stability of Nabam. The result shows the same trend as the electrochemical one (data not shown). Mercaptoethanol is well-known to enhance the stability of Nabam in acidic condition. The feasibility of utilizing this compound to improve the stability of Nabam in current applications was investigated. The result indicates that the mercaptoethanol possesses an electrochemical activity and

is not suitable for the current application. Thus, the acidity of pH 9 seems to be the best option to maintain its stability in a solution in this current project.

The rotating speed, in terms of the response behavior, is also equally critical as other operational conditions. The result indicates that the response current is proportional to the rotating speed between 49 to 900 rpm. The first rising portion (between 49 and 900 rpm) is attributed to the mass-transfer dominant process and thereafter the area of the curve indicates the region of kinetic-control. All the experiments were carried out at 1600 rpm.

### 3.3. Analytical Performance

The analytical characteristics of the prepared CoPC modified electrode were subsequently evaluated based on the above mentioned optimum conditions. A typical concentration dependent response curve of successive injections of Nabam on a cobalt phthalocyanine modified electrode is shown in Figure 5. The calibration plot is linear up to 36  $\mu\text{M}$  (correlation coefficient is 0.999), after which the curvature is observed. The slope of linear portion of calibration plot with least square treatment yield a sensitivity of 905.6  $\mu\text{M}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ .

The response time from 10% to 90% of the maximum signal requires 5.3 s upon the injection of 2  $\mu\text{M}$  Nabam. The characteristic of this response is suitable for developing a rapid analysis. A series of twenty successive measurements of 5  $\mu\text{M}$  Nabam was used to evaluate the precision of this scheme. A mean response current of this chemical sensor was 872.1 nA with a range of 828–940 nA and a relative standard deviation of 4.22%. The signal-to-noise characteristic ( $S/N = 3$ ) indicates that the detection limit of Nabam with CoPC modified electrode is 28.8 nM. The interference study indicated that there was only less than 1.0% signal decrease, as observed on the addition of 10  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  ions. The signal was reduced by about 12.2%,

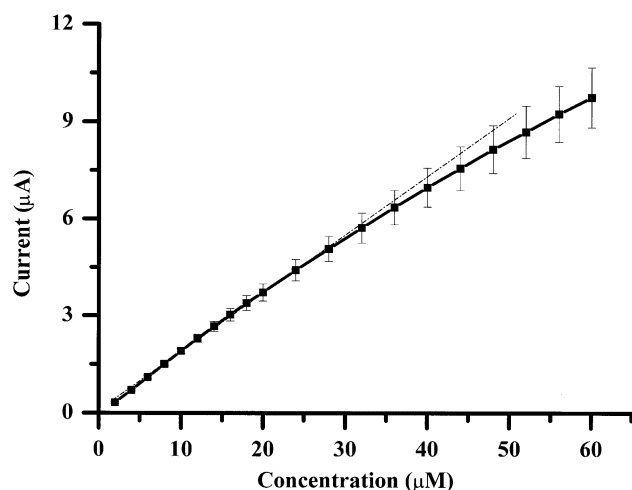


Fig. 5. The typical calibration plot of Nabam from cobalt phthalocyanine modified rotating disk electrode. Nabam concentration ranging between 2 to 60  $\mu\text{M}$  at 0.1 M phosphate buffer, pH 9.0. Other conditions as in Figure 2.

1.1%, and 26% at the addition of 2 ppm SDS, camphor, and humic acid, respectively.

Both Nabam and its metabolite ethylene thiourea (ETU) are representing an important class of pesticides and a carcinogenic residue resulting from Nabam metabolite pathway, respectively. Therefore both should be monitored closely in order to better understand the impact of the pesticide and ETU to the environment. The oxidative peak of ETU was at 0.660 V when a CoPC modified ink electrode was used, while, there was no apparent peak observed at the bare electrode before 1 200 mV. The oxidation peak of ETU is far more positive than the oxidative peaks of Nabam (at  $-0.125$  V) on the CoPC modified electrode. Thus, the two oxidative peaks of Nabam and ETU possess a reasonably good resolution for a simultaneous monitoring. No resolution issue should be concerned in the case of a single voltammetric scan. Thus, the feasibility of utilizing voltammetric schemes to monitor both Nabam and its metabolite simultaneously is demonstrated in Figure 6. Thus, this characteristic of the voltammetric scheme implies that both Nabam and its metabolite are possible to be detected in HPLC-EC, dual-electrode systems and this may help us to understand the impact toward our health/environment.

### 3.4. Real Sample Testing

To demonstrate the feasibility of utilizing the current scheme to measure Nabam on the environmental water samples. Two fortified samples were prepared by adding 3  $\mu\text{g}$  Nabam into 10 mL tap water and irrigation water. Subsequently, the concentration of Nabam in water samples were tested three times. The average recovery of Nabam of real water samples tested were found at 97.3% and 98.3% ( $n=3$ ), respectively. The results show that the method is applicable to water sprayed with solutions of Nabam. Based

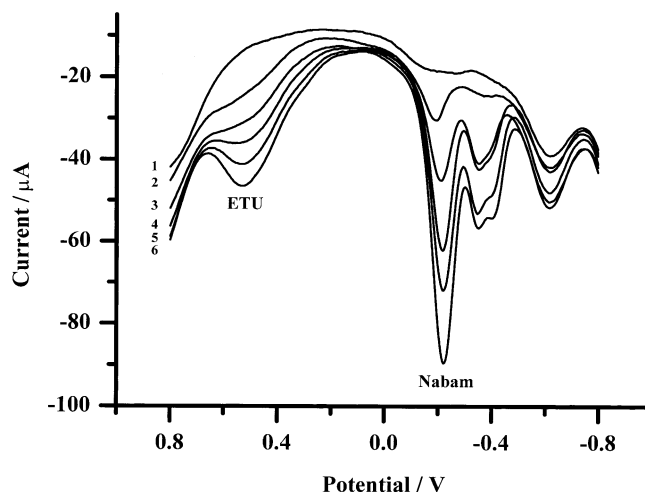


Fig. 6. Simultaneous voltammetric detection of both Nabam and ETU by a cobalt phthalocyanine modified electrode in phosphate buffer, pH 9. The concentrations of both ETU and Nabam are 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 mM for curves 1, 2, 3, 4, 5, and 6, respectively. Other conditions as in Figure 5.

on that the recoveries obtained were close to 100%, it may be assumed that no interfering substances were encountered.

## 4. Conclusions

We have successfully demonstrated a cobalt phthalocyanine modified carbon ink electrode as an easily prepared, sensitive and rapid measurement tool to measure Nabam. This proposed scheme is also sensitive enough to meet the sensitivity requirement of the JMPR Meeting. Other metal based ethylene bisdithiocarbamates, such as Zineb and many others, can be treated with di-sodium-EDTA at pH 9.25 [28] to convert to Nabam. Thus, it is possible to detect this series of EBDCs with this current scheme for the determination of Nabam. This proposed scheme should be interesting to those who are working in the field of environment impact study, food industry, and even public consumers.

## 5. Acknowledgement

We are grateful for the financial support from National Science Council in Taiwan (Grand No. NSC 91-2113-M-032-013).

## 6. References

- [1] B. D. Ripley, D. F. Cox, *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 1137.
- [2] D. R. Cooley, W. J. Manning, *Environmental Pollution* **1995**, 88, 315.

- [3] World Health Organization, *Environmental Health Criteria*, Vol. 78, World Health Organization, Geneva **1988**.
- [4] G. Vettorazzi, W. F. Almeida, G. J. Burin, R. B. Jaeger, F. R. Puga, A. F. Rahde, F. G. Reyes, S. Schvartsman, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen* **1995**, *15*, 313.
- [5] K. H. Gustafsson, R. A. Thompson, *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 729.
- [6] N. Ahmad, L. Guo, P. Mandarakas, V. Farah, S. Appleby, T. Gibson, *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 1417.
- [7] G. E. Keppel, *J. AOAC* **1969**, *52*, 162.
- [8] B. C. Verma, R. K. Sood, H. S. Sidhu, *Talanta* **1983**, *30*, 787.
- [9] V. K. Gupta, R. Kesari, *Talanta* **1998**, *45*, 1097.
- [10] R. Pastorelli, R. Allevi, S. Romagnano, G. Meli, R. Fanelli, *Arch. Toxicol.* **1995**, *69*, 306.
- [11] W. Schwack, B. Bruger, S. Nyanzi, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *351*, 297.
- [12] L. Mathew, M. L. P. Reddy, T. P. Rao, C. S. P. Iyer, A. D. Damodaran, *Talanta* **1996**, *43*, 73.
- [13] M. S. Lin, B. I. Jan, H. J. Leu, J. S. Lin, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *388*, 111.
- [14] R. P. Baldwin, M. K. Halbert, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 591.
- [15] J. P. Hart, A. K. Abass, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *342*, 199.
- [16] S. Shahrokhanian, M. K. Amini, I. Mohammadpoor-Baltork, S. Tangestaninejad, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 863.
- [17] S. Takase, Y. Shimizu, *Chem. Sens.* **2001**, *17*, 73.
- [18] J. Wang, R. Li, *Talanta* **1989**, *36*, 279.
- [19] J. Kuwano, T. Eguchi, Y. Saito, *Talanta* **1997**, *44*, 705.
- [20] C. Sun, Y. Sun, X. Zhang, D. Jiang, Q. Gao, H. Xu, J. Shen, *Thin Solid Films* **1996**, *288*, 291.
- [21] J. Wang, T. Golden, R. Li, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1642.
- [22] M. A. T. Gilmartin, J. P. Hart, *Analyst* **1994**, *119*, 833.
- [23] F. Mizutani, S. Yabuki, S. Iijima, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 59.
- [24] E. I. Iwuoha, A. Rock, M. R. Smyth, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 367.
- [25] E. Kilinc, A. Erdem, L. Gokgunnec, T. Dalbasti, M. Karaoglan, M. Ozsoz, *Electroanalysis* **1998**, *10*, 273.
- [26] M. A. T. Gilmartin, J. P. Hart, *Analyst* **1994**, *119*, 2331.
- [27] A. L. Hart, W. A. Collier, D. Janssen, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 645.
- [28] J. Pflugmacher, W. Ebing, Z. Lebensm, *Unters. Forsch.* **1980**, *170*, 349.

# Why Wait to Make Great Discoveries

When you can make them in an instant with  
**Wiley InterScience® Pay-Per-View and ArticleSelect™**

Now you can have instant, full-text access to an extensive collection of journal articles or book chapters available on Wiley InterScience. With Pay-Per-View and ArticleSelect™, there's no limit to what you can discover...

**ArticleSelect™** is a token-based service, providing access to full-text content from non-subscribed journals to existing institutional customers (EAL and BAL)

**Pay-Per-View** is available to any user, regardless of whether they hold a subscription with Wiley InterScience.

## Benefits:

- Access online full-text content from journals and books that are outside your current library holdings
- Use it at home, on the road, from anywhere at any time
- Build an archive of articles and chapters targeted for your unique research needs
- Take advantage of our free profiled alerting service, the perfect companion to help you find specific articles in your field as soon as they're published
- Get what you need instantly, no waiting for document delivery
- Fast, easy, and secure online credit-card processing for Pay-Per-View downloads
- Special, cost-savings for EAL customers: whenever a customer spends tokens on a title equaling 115% of its subscription price, the customer is auto-subscribed for the year
- Access is instant and available for 24 hours

96213129\_00

[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)

 **WILEY**  
**InterScience®**  
DISCOVER SOMETHING GREAT